

SÉRIE A, N° 3610.
N° D'ORDRE : 4482.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Lucienne SOSSOUNTZOV née BAUDRY

Première thèse : INFLUENCE DE LA NUTRITION MINÉRALE SUR
LA MORPHOLOGIE, LA CROISSANCE ET L'HISTOLOGIE DU SPORO-
PHYTE DE «MARSILEA DRUMMONDII» EN CULTURE ASEPTIQUE.

Deuxième thèse : PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 24 novembre 1960 devant la commission d'examen.

MM. PLANTEFOL *Président.*

CHADEFAUD..... } *Examineurs.*

Mme HUREL-PY..... }

PARIS

MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN (VI^e)

1962

SÉRIE A, n° 3610.
N° D'ORDRE : 4482.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Lucienne SOSSOUNTZOV née BAUDRY

Première thèse : INFLUENCE DE LA NUTRITION MINÉRALE SUR
LA MORPHOLOGIE, LA CROISSANCE ET L'HISTOLOGIE DU SPORO-
PHYTE DE «MARSILEA DRUMMONDII» EN CULTURE ASEPTIQUE.

Deuxième thèse : PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 24 novembre 1960 devant la commission d'examen.

MM. PLANTEFOL	<i>Président.</i>
CHADEFAUD	} <i>Examineurs.</i>
M ^{me} HUREL-PY	



PARIS

MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN (VI^e)

1962

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen J. PÉRÈS.

PROFESSEURS

MM.		MM.	
G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	QUELET	T Chimie organique.
DE BROGLIE	T Théories physiques.	CAGNIART	T Géophysique appliquée.
PRENANT	T Anatomie et Histologie comparées.	CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire.
PÉRÈS	T Mécanique des fluides et Applications.	CUVILLIER	T Micropaléontologie.
BARRABÉ	T Géologie structurale et Géologie appliquée.	JUNG	T Pétrographie.
BOURCART	T Géographie physique et Géologie dynamique.	TRILLAT	T Microscopie et Diffraction électronique.
PLANTEFOL	T Botanique.	WIEMANN	T Chimie organique et structurale.
GRASSÉ	T Évolution des êtres organisés.	JACQUINOT	T Spectroscopie et Physique céleste.
PRÉVOST	T Chimie organique.	VASSY	T Physique de l'Atmosphère
BOULIGAND	T Application de l'analyse à la géométrie.	DESTOUCHES	T Théories physiques.
CHAUDRON	T Chimie appliquée.	PRUVOST	T Géologie.
WYART	T Minéralogie.	AMIEL	T Chimie générale.
TEISSIER	T Zoologie.	HOCART	T Minéralogie.
MANPENOT	T Biologie végétale.	J. P. MATHIEU	T Physique (Orsay).
P. AUGER	T Physique quantique et relativité.	COUTEAUX	T Biologie animale (P. C. B.).
MONNIER	T Physiologie générale.	MAY	T Zoologie (Orsay).
PIVETEAU	T Paléontologie.	CHOQUET	T Théorie des fonctions et Topologie.
ROCARD	T Physique (E. N. S.).	FELDMANN	T Biologie végétale marine.
H. CARTAN	T Mathématiques (E. N. S.).	GUINIER	T Physique des Solides.
LAFFITTE	T Chimie générale.	JOST	T Physiologie comparée.
FAVARD	T Géométrie supérieure.	FORTET	T Calcul des probabilités et physique mathématique.
COULOMB	T Physique du Globe.	SCHWARTZ	T Calcul différentiel et Intégralité.
M ^{lle} COUSIN	T Biologie animale (S. P. C. N.).	CHOUARD	T Physiologie végétale.
CHRÉTIEN	T Chimie minérale.	MALAVARD	T Aviation.
P. DRACH	T Zoologie.	BRELOT	T Calcul différentiel.
KASTLER	T Physique (E. N. S.).	NORMANT	T Synthèse organique.
EPHRUSSI	T Génétique.	BENARD	T Chimie minérale.
WURMSER	T Biologie physico-chimique	BUVAT	T Botanique (E. N. S.).
RIVIÈRE	T Géologie (S. P. C. N.) (Orsay).	DUGUÉ	T Statistiques mathématiques.
GAUTHERET	T Biologie végétale (P. C. B.).	GELOSO	T Chimie (S. P. C. N.).
LUCAS	T Recherches physiques.	SOULAIRAU	T Psychophysiologie.
A. THOMAS	T Biologie cellulaire.	ULRICH	T Physiologie végétale.
ARNULF	T Optique appliquée.	MARÉCHAL	T Optique théorique et appliquée.
M. MORAND	T Enseignement de physique.	KIRRMANN	T Théories chimiques.
SOLEILLET	T Physique (P. C. B.).	CHADEFAUT	T Botanique.
FORTIER	T Mécanique expérimentale des fluides.	M ^{lle} LE BRETON	T Physiologie générale.
DANJON	T Astronomie.	SALEM	T Mathématiques générales.
PETIT	T Biologie maritime.	LELONG	T Mathématiques générales.
QUENEY	T Météorologie et Dynamique atmosphérique.	DEVILLERS	T Anatomie et Histologie comparées.
GALLIEN	T Embryologie.	EHRESMANN	T Topologie algébrique.
EICHORN	T Biologie végétale (S. P. C. N.).	FRANCON	T Physique (S. P. C. N.).
DE CUGNACT	T Biologie végétale (S. P. C. N.).	GLANGEAUD	T Géographie physique et Géologie dynamique.
M ^{lle} CAUCHOIS	T Chimie physique.	GODEMENT	T Mathématique (M. G. P.).
THELLIER	T Physique du Globe.	PISOT	T Techniques mathématiques de la Physique.
L'HÉRITIER	T Génétique.	E. ROCH	T Géologie.
GRIVET	T Radioactivité.	SCHATZMANN	T Astrophysique.
PONCIN	T Mécanique générale.	TERNIER	T Paléontologie stratigraphique.
DUBREIL	T Arithmétique et Théorie des nombres.	ZAMANSKY	T Mathématiques générales.
		LENNUIER	T Physique (M. G. P.).
		RIZET	T Génétique.
		ROUTHIER	T Géologie appliquée.

MM.

M ^{me} TONNELAT	T	Relativité.
DIXMIER	T	Mathématiques (M. P. C.).
SOUCHAY	T	Chimie générale.
AIGRAIN	T	Électrotechnique générale
BRUSSET		Chimie minérale.
M. LÉVY	T	Physique théorique des hautes énergies.
M ^{me} CHAIX		Chimie biologique.
M ^{me} HUREL-PY		Biologie végétale (P. C. B.).
PIAUX	T	Chimie (M. P. C.).
BRUN	T	Mécanique expérimentale des Fluides.
LEDERER	T	Chimie biologique.
M ^{me} DUBREIL	T	Mathématiques.
M ^{me} LELONG	T	Mathématiques (E. N. S.).
BELLAIR	T	Géologie (S. P. C. N.).
COTTE	T	Physique (Orsay).
DUBOIS (J. E.)	T	Chimie organique.
LAMOTTE		Zoologie (E. N. S.).
A. MICHEL	T	Chimie (S. P. C. N.).
OLMER	T	Énergétique générale.
ROUAULT	T	Physique générale.
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
BARCHEWITZ	T	Chimie physique.
BROSSEL	T	Physique atomique.
BUSER		Physiologie comparée.
CAMUS		Physiologie végétale (3 ^e cycle).
CASTAING		Physique générale.
CURIEN		Minéralogie et cristallographie.
MOYSE	T	Physiologie végétale (Orsay).
PANNETIER		Chimie (S. P. C. N.).
POSSOMPES	T	Zoologie.
PULLMANN		Chimie théorique.
TEILLAC		Physique nucléaire et Radioactivité.
TONNELAT		Biologie physico-chimique
VILLE	T	Économétrie.
WILLEMART		Chimie (P. C. B.).
DODE	T	Chimie (S. P. C. N.) (Orsay).
FREYMAN	T	Physique générale.
GUINOCHE	T	Biologie végétale (Orsay).
ROLLET	T	Chimie (P. C. B.).
M ^{lle} JOSIEN	T	Chimie (P. C. B.).
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et Théorie des groupes.
ARNOULT	T	Électronique.
CHAPELLE	T	Physique (M. P. C.) (Orsay).
DELANGE	T	Mathématiques (Orsay).
DENY	T	Mathématiques (M. G. P.).
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides.
G. LUCAS	T	Géologie.

MM.

ALLARD		Chimie physique.
BERTHELOT		Physique nucléaire et Radioactivité.
BRICARD		Météorologie et Physique de l'Atmosphère.
M ^{me} ALBE-FESSARD		Psychophysiologie.
FRIEDEL		Physique des solides.
M. JULIA		Étude des molécules organiques complexes.
LENDER		Biologie animale (S. P. C. N.) (Orsay).
MAGAT		Physico-chimie des rayonnements.
M ^{lle} QUINTIN	T	Électrochimie.
MONOD	T	Chimie du métabolisme.
BENOIT	T	Physiologie animale.
DE POSSEL	T	Analyse numérique.
CHARLOT	T	Chimie analytique.
HAUSSINSKY	T	Radiochimie.
LEMÉE	T	Physiologie (B. M. P. V.).
GUÉRIN	T	Chimie (M. P. C.).
M. CHATELET		Chimie (S. P. C. M.).
JEAN		Physique nucléaire et Radioactivité.
NATTLER		Physique (S. P. C. N.).
L. MICHEL		Physique théorique des hautes énergies.
RUMPF		Chimie (P. C. B.).
BERGERARD		Zoologie (Orsay).
BERTIN		Électronique.
BOUSSIÈRES		Chimie des radioéléments
M ^{me} COUTURE		Physique (P. C. B.).
ELLENBERGER		Géologie structurale et Géologie appliquée.
FRANC		Biologie animale.
SCHNELLE		Botanique tropicale.
STOLKOWSKY		Physiologie générale.
ACHER		Chimie biologique (Orsay).
BAUDOIN		Biologie animale (P. C. B.).
BEAUMONT		Biologie animale (S. P. C. N.).
BLAMONT		Géophysique ionosphère
BOURREAU		Biologie végétale. (S. P. C. N.) (Orsay).
D. CURIE		Physique (M. G. P.).
DURAND-DELGA		Géologie.
FRÉON		Chimie (P. C. B.).
HELLER		Physiologie végétale.
TORTRAT		Calcul des probabilités.
CAILLEUX		Géologie (S. P. C. N.).
MAGNAN		Physique (M. P. C.).
DAUDEL		Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire.
M ^{lle} FOURCROY		Biologie végétale (S. P. C. N.).

Secrétaire général R. POUILLAIN.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553814_0034

INFLUENCE DE LA NUTRITION MINÉRALE SUR LA MORPHOLOGIE, LA CROISSANCE ET L'HISTOLOGIE DU SPOROPHYTE DE *MARSILEA DRUMMONDII* A. BR. EN CULTURE ASEPTIQUE

Par Lucienne SOSSOUNTZOV

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	175
HISTORIQUE	178

Chapitre premier. — Techniques.

I. — TECHNIQUES DE CULTURE DU SPOROPHYTE	183
A. <i>Obtention du sporophyte à partir des sporocarpes</i>	183
B. <i>Techniques de multiplication indéfinie des cultures</i>	183
C. <i>Milieux de culture</i>	185
1° Milieu témoin ou milieu de référence ; 2° Autres milieux.	
D. <i>Précisions sur les conditions dans lesquelles s'effectue le développement des sporophytes</i>	186
II. — TECHNIQUES D'OBSERVATION DES SPOROPHYTES	186
III. — TECHNIQUES ANALYTIQUES.....	186
A. <i>Détermination du poids frais et du poids sec</i>	187
B. <i>Techniques de dosages</i>	187
1° Dosage du calcium ; 2° Dosage des tanins ; 3° Dosage de l'azote.	
C. <i>Détermination du contenu auxinique</i>	187
IV. — TECHNIQUES HISTOLOGIQUES.....	191
A. <i>Anatomie du rhizome</i>	191
B. <i>Histologie de l'apex</i>	191

Chapitre II. — Expériences préliminaires.

I. — DESCRIPTION DU SPOROPHYTE TÉMOIN.....	192
A. <i>La jeune plantule</i>	192
B. <i>Le sporophyte en culture illimitée</i>	195
II. — MODE DE DÉVELOPPEMENT DE L'EXPLANTAT.....	197

III. — ÉTUDE COMPARATIVE DE L'HOMOGENÉITÉ DE LA CROISSANCE DES DIFFÉRENTS EXPLANTATS ET DES PLANTS QUI EN DÉRIVENT	197
IV. — CHOIX D'UN CRITÈRE PONDÉRAL.....	201
V. — ACTION DU PH DES SOLUTIONS NUTRITIVES.....	201
VI. — STRUCTURE ANATOMIQUE DU RHIZOME DU SPOROPHYTE TÉMOIN.....	203
VII. — INFLUENCE DU CHLORURE DE SODIUM SUR LE DÉVELOPPEMENT DU SPOROPHYTE.....	206

Chapitre III. — Action des divers macro-éléments considérés isolément.

I. — LES IONS CALCIUM.....	210
A. <i>Influence de la carence calcique</i>	210
1° Aspect morphologique ; 2° Fréquence des différents types morphologiques ; 3° Accroissement pondéral ; 4° Structure anatomique du rhizome ; 5° Dosage du calcium ; 6° Teneur en eau ; 7° Observations complémentaires.	
B. <i>Action des ions calcium</i>	225
1° Aspect morphologique ; 2° Données quantitatives ; 3° Structure anatomique du rhizome.	
II. — LES IONS MAGNÉSIUM	233
A. <i>Influence de la carence en magnésium</i>	233
B. <i>Action des ions magnésium</i>	235
1° Aspect morphologique ; 2° Données quantitatives ; 3° Structure anatomique du rhizome.	
III. — LES IONS POTASSIUM	242
A. <i>Influence de la carence en potassium</i>	242
B. <i>Action des ions potassium</i>	245
1° Aspect morphologique ; 2° Données quantitatives ; 3° Structure anatomique du rhizome.	
IV. — LES IONS NITRIQUES ET AMMONIACAUX	249
A. <i>Influence de la carence nitrique</i>	249
B. <i>Action des ions nitriques</i>	251
1° Aspect morphologique ; 2° Données quantitatives ; 3° Structure anatomique du rhizome.	
C. <i>Apport d'azote sous forme ammoniacale</i>	253
1° Aspect morphologique ; 2° Accroissement pondéral ; 3° Structure anatomique du rhizome.	
V. — LES IONS SULFURIQUES	258
A. <i>Influence de la carence en soufre</i>	258
B. <i>Action des ions sulfuriques</i>	261
1° Aspect morphologique ; 2° Données quantitatives ; 3° Structure anatomique du rhizome.	
VI. — LES IONS PHOSPHORIQUES	266
A. <i>Influence de la carence en phosphore</i>	266
B. <i>Action des ions phosphoriques</i>	267
1° Aspect morphologique ; 2° Données quantitatives ; 3° Structure anatomique du rhizome.	
VII. — RÉSUMÉ GÉNÉRAL.....	270

**Chapitre IV. — Effets des variations simultanées
de la concentration en macro-éléments.**

I. — EFFETS DES VARIATIONS SIMULTANÉES DE LA CONCENTRATION EN CATIONS	275
A. <i>Résultats généraux</i>	275
B. <i>Étude des sporophytes ramifiés</i>	279
1° Sur le milieu à « Ca hypo/Mg hyper/K hyper » ; 2° Sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper/K hypo » ; 3° Sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper/K opt » ; 4° Sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper/K hyper ».	
C. <i>Rôles joués par le calcium et le magnésium dans les phénomènes de développement des bourgeons latéraux</i>	286
1° Étude de la carence double en calcium et magnésium ; 2° Variations de la teneur en magnésium d'un milieu dépourvu de calcium ; 3° Importance du rapport Ca/Mg sur le développement normal ou aberrant du sporophyte de <i>M. d.</i> ; 4° Conclusions.	
D. <i>Recherches complémentaires sur les sporophytes cultivés sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper/K opt »</i>	290
1° Teneur en eau ; 2° Transplantation sur milieu témoin des sporophytes ramifiés ; 3° Essais de milieux à « Ca opt/K opt » et magnésium variable.	
II. — EFFETS DES VARIATIONS SIMULTANÉES DE LA CONCENTRATION EN ANIONS.	294
III. — PROPOSITION D'UN MILIEU AMÉLIORÉ.....	299
A. <i>Milieux étudiés</i>	299
B. <i>Formule du milieu amélioré</i>	302

Chapitre V. — Étude des sporophytes ramifiés.

I. — RECHERCHES DES FACTEURS JOUANT UN RÔLE DANS LE DÉTERMINISME DE LA RAMIFICATION	304
A. <i>Rôle des substances de croissance : détermination du contenu auxinique des sporophytes témoins ou ramifiés</i>	304
1° Observations préliminaires ; 2° Estimation du contenu auxinique basée sur le test avoine ; 3° Estimation du contenu auxinique basée sur le test <i>Marsilea</i> .	
B. <i>Essais de contrôle des résultats obtenus</i>	317
1° Action de l'AIA sur les sporophytes ramifiés ; 2° Action des inhibiteurs ou antagonistes de l'AIA sur les sporophytes témoins.	
C. <i>Rôle des feuilles et des racines sur l'inhibition corrélative des bourgeons</i>	321
1° Expériences sur nœuds isolés ; 2° Expériences sur un ensemble de nœuds.	
D. <i>Essai d'interprétation de la ramification expérimentale du Marsilea</i>	326
II. — FONCTIONNEMENT ET STRUCTURE DES POINTS VÉGÉTATIFS DES SPOROPHYTES TÉMOINS ET DES SPOROPHYTES RAMIFIÉS.	
Variations du pouvoir organogène des apex principaux et latéraux en fonction de la composition du milieu nutritif	327
A. <i>Fonctionnement des points végétatifs principaux</i>	328
1° Nombre et degré de développement des feuilles visibles à l'œil nu formées en quarante-cinq jours par l'apex principal ; 2° Nombre et degré de développement des ébauches foliaires du bourgeon terminal.	

B. <i>Fonctionnement des points végétatifs latéraux</i>	330
1° Nombre des feuilles visibles à l'œil nu portées par les ramifications ;	
2° Organes à l'état d'ébauches dans les bourgeons latéraux.	
Structure des apex principaux et latéraux des sporophytes témoins ou ramifiés.	336
A. <i>Structure des apex de sporophytes témoins</i>	336
1° Apex principal ; 2° Apex latéral.	
B. <i>Structure des apex de sporophytes carencés en calcium</i>	343
1° Sporophytes de type 1 ; 2° Sporophytes de type 3.	
C. <i>Structure des apex de sporophytes cultivés sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper/K opt »</i>	356
1° Sporophytes de premier passage ; 2° Sporophytes de deuxième passage.	
III. — DE QUELQUES MODIFICATIONS DU MÉTABOLISME DES SPOROPHYTES RAMIFIÉS	359
A. <i>Dosage des tanins</i> .	
B. <i>Métabolisme de l'azote</i> .	
C. <i>Conclusions générales</i> .	
 Conclusions et considérations générales. 	
I — EXPOSÉ DES PRINCIPAUX RÉSULTATS.....	362
A. <i>Recherches préliminaires</i>	362
B. <i>Modifications des caractères qualitatifs et quantitatifs des sporophytes sous l'effet de la nutrition minérale</i>	363
1° Aspect morphologique du sporophyte ; 2° Croissance des sporophytes ;	
3° Structure anatomique du rhizome.	
C. <i>Étude des cultures ramifiées</i>	370
II. — CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES.....	374
A. <i>Sur l'aspect morphologique du sporophyte</i>	374
B. <i>Sur la valeur nutritive des divers milieux de culture</i>	379
C. <i>Sur la structure anatomique du rhizome</i>	380
D. <i>Sur la ramification des sporophytes</i>	384
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	389

INTRODUCTION

Le présent travail porte sur un aspect de la physiologie du développement *in vitro* du sporophyte de la Fougère *Marsilea drummondii* A. Br. : le conditionnement et la modification de ce développement par la nutrition minérale.

Pourquoi avons-nous effectué ce travail ? Parce qu'il est tentant de connaître, dans des conditions expérimentales rigoureusement contrôlables, les divers mécanismes qui assurent l'édification de la plante sans que s'exercent sur elle les multiples actions qui se manifestent dans les conditions naturelles. Cette question a été de nombreuses fois étudiée sur des Phanérogames ou sur des Thallophytes. Par contre, les Ptéridophytes sont très mal connus à cet égard. Il suffit, pour s'en convaincre, de rechercher les indications bibliographiques en matière de Ptéridologie : si le gamétophyte a été jusqu'à ce jour l'objet de recherches physiologiques précises et nombreuses, le sporophyte demeure mal connu. Sur lui, on ne peut réunir que quelques indications générales, quelques notes éparses. Il faut attendre l'année 1951 pour que paraisse le premier travail important (SCHWABE). Depuis, le nombre des publications sur ce sujet et, plus généralement, sur la physiologie du sporophyte des Fougères ne dépasse pas la vingtaine. A quoi attribuer une telle situation ?

Tout d'abord, à une différence de maniabilité des deux générations de la Fougère, gamétophyte et sporophyte. Alors que le premier, de volume très réduit, peut être aisément soumis aux méthodes bactériologiques de culture aseptique, le second, souvent de taille importante, exige pour cela une mise au point technique préalable souvent délicate (possibilité de multiplication indéfinie, choix d'un substrat de culture). D'autre part, les résultats obtenus sur le sporophyte que caractérise une complexité organique et physiologique plus poussée sont plus difficiles à interpréter que ceux fournis par le gamétophyte, organisme simple (en apparence du moins). Enfin, troisième cause possible à invoquer : la vitesse de croissance. Obtenus à partir de la spore, le prothalle atteint en général la maturité en quelques semaines ; dans les mêmes conditions, le sporophyte des Fougères communes exige une attente beaucoup plus longue. D'autres raisons sans doute peuvent être énumérées. Quelles qu'elles soient, un fait demeure frappant : notre ignorance quant aux facteurs qui contrôlent l'édification du sporophyte. C'est là précisément une justification du travail que nous avons entrepris. Le sens que nous lui avons donné — l'étude des facteurs nutritifs qui conditionnent le développement de la plante — n'est pas original. Il nous a paru nécessaire de courir le risque

de répéter les nombreuses recherches antérieures faites sur ce sujet. Il ne faut pas oublier, en effet, que chaque groupe végétal, sinon chaque espèce, possède ses particularités propres. Or, répétons-le, nos connaissances sur le sporophyte sont très rudimentaires.

* * *

Précisons maintenant pourquoi il a porté sur le *Marsilea*. Pourquoi en effet ne pas avoir choisi une Fougère commune dans nos régions ? Cela s'explique par le fait que les cultures aseptiques de Filicinées telles qu'on sait actuellement les réaliser, soit à partir d'apex, soit à partir d'embryons portés par le prothalle, ne constituent guère un matériel favorable : impossibilité d'obtenir des cultures nombreuses à partir d'une même souche, lenteur de prolifération, difficulté de prélèvement d'explantats d'importance égale, d'où irrégularité de leur croissance, enfin, incommodité de maniement par suite de la densité générale des cultures. Tous ces caractères obligeaient à rechercher une espèce différente qui ne présentât pas de tels inconvénients. Le sporophyte de *Marsilea* est, à cet égard, intéressant. En effet, par sa structure d'ensemble, il se prête à une fragmentation aisée (d'où des explantats relativement nombreux et semblables à partir d'une seule souche). La croissance de ces explantats est rapide : il suffit de un à deux mois pour que se forme une culture « adulte ». Il ne nécessite pas de substrat de culture spécial : le *Marsilea*, plante aquatique, se développe normalement en milieux aqueux. Enfin, de taille relativement réduite, il est d'une parfaite maniabilité.

* * *

Il ne reste plus, à présent, qu'à délimiter le champ de nos recherches et à en indiquer l'orientation générale.

Les techniques de culture, une fois mises au point, ont été soumises à un examen expérimental critique : de ce fait, se trouvaient connues et estimées les principales causes susceptibles d'intervenir sur le développement du sporophyte.

La méthode de travail ainsi précisée permettait d'étudier avec le maximum de sûreté souhaitable les besoins nutritifs des cultures. Seuls, à cet égard, ont été considérés les éléments minéraux. Les modifications de la concentration en cations ou en anions ont porté sur un seul ion isolément des autres, ou sur plusieurs ions conjointement. Cette partie de notre travail a comporté de multiples aspects : accroissement pondéral, morphologie et anatomie des cultures, mensurations des divers organes de la plante, examen des anomalies dues aux carences ou aux excès alimentaires, mises en évidence d'interactions ioniques, autant de points dont l'interprétation ne pouvait être envisagée qu'au prix de recherches connexes : histologie des points végétatifs, dosages divers, examen des facteurs hormonaux responsables de l'organogenèse.

Dans les conclusions, nous nous sommes efforcée de donner une cohérence aux principaux résultats obtenus en les confrontant avec ceux que d'autres chercheurs avaient précédemment obtenus sur des Végétaux appartenant le plus souvent à d'autres groupes que celui des Ptéridophytes.

Tel qu'il se présente, ce travail constitue donc un premier pas fait de manière systématique vers la connaissance du rôle de la nutrition minérale sur le sporophyte de Fougère. C'est aussi dire que, s'il apporte des faits nouveaux dans ce domaine, il en laisse beaucoup d'autres dans l'incertitude.

* * *

Quelques indications, pour finir, sur la plante qui a servi de matériel d'expérimentation.

Le *Marsilea drummondii* A. Br. appartient à la famille des Marsilacées, Filicales leptosporangiées, qui ne comprend que trois genres : *Marsilea*, *Regnellidium* et *Pilularia*. Contrairement à la plupart des Filicinées, les Marsilacées sont hétérospores. Leurs spores sont portées par des sporanges différents : méga- et microsporangies. Ceux-ci sont groupés en sores dans un repli de nature foliaire, le *sporocarpe*. A maturité, le sporocarpe éclate, permettant la mise en liberté des méga- et des microspores. Les microspores produisent des prothalles ♂, qui portent plus tard une seule anthéridie. Les mégaspores donnent naissance à des prothalles ♀ porteurs à maturité d'un archégone unique. L'édification des prothalles à partir des spores est extrêmement rapide (12 à 22 heures), de même que les premières phases du développement de l'embryon formé à la suite de la fécondation.

L'espèce sur laquelle ont porté nos recherches, le *Marsilea drummondii* A. Br. (en abrégé *M. d.*), est originaire du Sud-Est de l'Australie.

* * *

Ce travail a été accompli au laboratoire de Biologie végétale de la Faculté des Sciences de Paris, sous la direction de M^{me} HUREL-PY, professeur au P. C. B. Après nous avoir réservé un accueil bienveillant dans son laboratoire où elle a su créer un climat amical, elle nous a sans cesse stimulée dans notre effort par les encouragements qu'elle a su nous prodiguer. Que ces pages lui soient l'expression de notre profonde et fidèle reconnaissance.

Nous éprouvons à l'égard de M. le professeur PLANTEFOL, membre de l'Institut, qui nous a fait l'honneur de présider notre jury, une vive et respectueuse gratitude.

Nous prions M. le professeur CHADEFAUD, qui a toujours suivi avec intérêt en qualité de parrain au C. N. R. S. le cours de ces recherches, de recevoir nos sincères remerciements. Nous lui savons vivement gré d'avoir bien voulu, en outre, accepter d'être membre du jury.

Nous sommes très reconnaissante à nos collègues et amis des laboratoires de Biologie et de Physiologie végétales, ainsi qu'à ceux de Botanique, de nous avoir initiés à des techniques que nous ne connaissons pas, de nous avoir donné des conseils qui nous ont été précieux et de nous avoir permis d'effectuer cette étude dans une ambiance cordiale.

Le Centre National de la Recherche Scientifique nous a aidée à réaliser ce travail. Nous l'assurons de notre gratitude.

HISTORIQUE

Les travaux consacrés à l'étude de la nutrition minérale des Végétaux supérieurs sont trop nombreux pour que nous puissions les énumérer ici. D'excellentes bibliographies existent sur ce sujet dans les revues spécialisées (*Annuals Reviews of Biochemistry*, *Annuals Reviews of Plant Physiology*). Nous leur adjoindrons celle réunie par HELLER [93] : elle comprend des références nombreuses, pour la plupart très récentes. Peu d'auteurs, par contre, ont cherché à déterminer le rôle des éléments minéraux sur le développement du sporophyte des Fougères. Parmi ceux qui s'y sont intéressés, les uns ont travaillé dans des conditions non aseptiques, d'autres en culture pure. Parmi les premiers, citons tout d'abord SCHWABE [163-164] : entreprenant en 1951 l'étude de la nutrition minérale du sporophyte de *Pteridium aquilinum*, il constate qu'il n'a pas trouvé *a single paper on the nutrition of the diploid generation of any fern*. Les recherches qu'il entame alors ont deux buts précis : du point de vue théorique, comparer le comportement de cette Fougère à celui des Végétaux supérieurs déjà étudiés et, du point de vue pratique, déterminer les conditions nutritives qui pourraient permettre aux agriculteurs de se débarrasser de cette « mauvaise herbe » dont l'expansion rapide dans les terrains cultivés est fort gênante. Pour mener à bien ses investigations, il la cultive sur des milieux nutritifs divers, mais observe surtout les effets de la nutrition phosphatée, potassique et accessoirement azotée sur la production et la longévité des feuilles, la surface foliaire. Ces caractères extérieurs de la plante sont très réduits en cas de déficience en P et en K et s'accompagnent de modifications internes (teneur en eau des tissus, métabolisme glucidique, taux d'assimilation...). L'auteur est rapidement amené à constater la présence d'interactions complexes entre les différents éléments nutritifs et à déterminer les effets que causent la carence ou les doses toxiques de tels facteurs. De l'ensemble de cette étude, il ressort que le sporophyte de *Pteridium* se comporte vis-à-vis de l'azote, du phosphore et du potassium comme les plantes plus évoluées, telles que le lin et le chanvre, expérimentées dans des conditions semblables. A ce résultat théorique s'ajoute une conclusion pratique : la Fougère est relativement peu sensible aux conditions nutritives auxquelles on la soumet et peut continuer de croître, même si elles sont défectueuses : il n'est donc pas possible d'espérer la détruire en la soumettant artificiellement à des traitements nocifs.

Plus intéressants pour nous puisque se rapportant à l'étude d'une Marsiléacée, le *Regnellidium diphyllyum*, sont les travaux de VOTH et BLOOM parus en 1955-1956 [34, 35, 205]. Ils portent sur les effets que produisent les éléments minéraux habituellement présents dans les milieux de culture, Ca^{++} , K^+ , Mg^{++} pour les cations ; NO_3^- , SO_4^{--} , PO_4H_2^- pour les anions. Ces auteurs observent, d'une part, que leur suppression occasionne des modifications de la morphologie et de la croissance de la plante. Elles sont rapidement décelables et affectent la taille, la forme, la pigmentation et le développement des différents organes. D'où la conclusion que les macro-éléments énumérés sont indispensables au *Regnellidium*. Dans une autre série de recherches, VOTH et BLOOM analysent les effets de nombreux milieux minéraux dont la composition est établie suivant la méthode dite « triangulaire ». Au terme de leur étude, ils proposent une solution nutritive dont la composition minérale est la plus favorable à leur sujet d'expérimentation. Ce milieu « optimum » est riche en calcium, en azote et en sulfate, et pauvre en potassium, en magnésium et en phosphore.

Signalons encore le travail de CONWAY et STEPHENS paru plus récemment (1957) [60]. Il porte sur la nutrition du sporophyte de *Pteridium aquilinum* comme celui de SCHWABE. L'étude, menée d'un point de vue purement écologique, est restreinte à l'action des ions Ca^{++} , K^+ , NO_3^- , NH_4 et PO_4^{---} en quantités telles qu'on les emploie en agriculture. Les résultats obtenus montrent que le nombre des frondes initiées à l'apex dépend de la concentration du milieu en éléments minéraux, et que la richesse de la solution minérale a pour effet de permettre une meilleure résistance des bourgeons de la Fougère aux conditions climatiques rigoureuses de l'hiver, d'où sa ramification et son pouvoir de multiplication plus importants. De l'ensemble de leurs résultats, les auteurs concluent que les éléments minéraux *may have a greater effect than has yet been recognized on rate of growth and colonization*.

Toutes ces recherches, bien que fort intéressantes en ce qu'elles montrent l'importance de la composition minérale du milieu nutritif sur le développement du sporophyte, sont effectuées en l'absence de toute précaution d'asepsie, ce qui en limite la portée. D'une part, elles ne permettent pas d'évaluer avec précision les exigences nutritives de la plante ; d'autre part, elles n'envisagent que certains des problèmes posés par la physiologie de la croissance en fonction de la nutrition minérale et ne peuvent constituer à cet égard que des travaux préliminaires.

En culture aseptique, les sporophytes étudiés sont l'*Azolla Caroliniana* (NICKELL [141]) et le *Marsilea drummondii* (ALLSOPP [de 5 à 14]).

Le travail de NICKELL ne nous intéresse que dans la mesure où il montre que l'emploi d'un milieu synthétique composé des sels habituellement employés, de vitamines et de micro-éléments, adapté à la croissance d'embryons ou de dicotylédones aquatiques, permet un bon développement du sporophyte d'*Azolla*.

Le travail d'ALLSOPP est pour nous d'un intérêt particulier : nous lui devons en effet le principal de nos connaissances sur les différentes condi-

tions et phases du développement du *Marsilea*. Ses publications, beaucoup plus nombreuses que les travaux déjà cités, échelonnées de 1952 à 1956, nous ont donné de précieux renseignements sur les facteurs qui influencent la morphologie, la croissance et l'histologie de la Fougère. Nous nous y référerons souvent pour deux raisons. D'une part, parce qu'elles portent sur le même matériel que celui que nous avons choisi pour nos recherches ; d'autre part, parce qu'il sera intéressant de comparer les résultats donnés par les jeunes plantules qu'utilise cet auteur à ceux que fournissent les sporophytes soumis à de nombreux repiquages, tels que nous les obtenons.

L'importance que nous avons accordée aux recherches d'ALLSOPP ne provient pas cependant de ce qu'elles ont porté sur la nutrition minérale du *Marsilea* : de ce point de vue, elles sont limitées à l'étude rapide des effets provoqués par différentes concentrations globales du milieu de base (solution de Knop diluée de son volume d'eau) sur le développement et la morphologie de la jeune plantule issue du sporocarpe. C'est plutôt à d'autres facteurs : sucres, substances de croissance synthétiques, qu'il fait appel pour modifier les séquences naturelles de la Fougère : ses feuilles sont successivement uni, bi et quadrifoliées. En perturbant les conditions nutritives minérales, glucidiques ou autres, ALLSOPP observe l'apparition de feuilles dites *juvéniles*, c'est-à-dire spatulées ou bifides, sur des plants qui, normalement, devraient porter des feuilles quadrifides, dites *adultes*. Se plaçant surtout en morphologiste, il montre que « le développement hétéroblastique du *Marsilea drummondii* est lié à sa nutrition et dépend directement de la taille de l'apex terminal influencé lui-même par son état métabolique ». Mais ne vaut-il pas mieux le laisser conclure [72] ? *The heteroblastic development of Marsilea, and probably of most others plants is not normally limited by the synthesis of specific morphogenetic substances but is dependent on the size and activity of the shoot apex which in turn is controlled by the supply of the basic nutrients necessary for the synthesis of various substances, particularly proteins required for cellular growth and division.*

Alors que la bibliographie portant sur la nutrition minérale du sporophyte des Filicinées est très mince, la somme des travaux consacrés à leur morphologie générale, observée dans des conditions très variables (lumière, température, humidité, nutrition), ou à leur embryologie est importante et s'échelonne de 1868 (travaux de HORMEISTER) à nos jours (en particulier travaux de l'école de Manchester, sous l'impulsion de WARDLAW). Citons rapidement les recherches de ANGST [16], BONNET [36-37], BOODLE [38], BOWER [40-41], CROTTY [62], CUTTER [63-64], GÖBEL [85 à 88], GOTTLIEB [91], LANG [118-119], SCHNEIDER [161], STEEVES et SUSSEX [184, 187, 188], THOMPSON [195] et WARDLAW [208 à 220], auxquelles nous serons amenée à nous référer au cours des chapitres qui vont suivre.

Telles sont, à l'heure actuelle, nos connaissances sur le sporophyte des Ptéridophytes, matériel beaucoup plus étudié par les morphologistes que par les physiologistes.

Il était donc intéressant de reprendre, de ce dernier point de vue, les

résultats connus à ce jour en les basant sur des observations plus complètes, qualitatives et quantitatives, et d'envisager systématiquement le rôle des éléments nutritifs inorganiques qui permettent à la plante de croître.

Pour terminer ce nécessairement bref aperçu historique, il nous a paru opportun de dresser la liste des milieux de culture qui ont été utilisés par nos prédécesseurs.

L'examen des tableaux I et I *bis* montre que ces milieux diffèrent, tant par la qualité que par la quantité des sels employés. Nous les consulterons

TABLEAUX I ET I *bis*. — COMPOSITION NUMÉRALE DE QUELQUES MILIEUX UTILISÉS POUR LA CULTURE DES SPOROPHYTES DE FOUGÈRES.

	ALLSOPP, WETMORE. Knop dilué à 50 p. 100.	VOTH, BLOOM. Hoagland, n° 1.	CONWAY, STEPHENS.	SCHWABE.
$(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$, 4 H_2O	500 mg	1 180,8	500	440
NO_3K	125 mg	505,5	—	—
SO_4Mg , 7 H_2O	125 mg	493	450	125
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	125 mg	136	300	—
KCl	—	—	300	—
NO_3Na	—	—	—	456
$\text{PO}_4\text{H Na}_2$, 12 H_2O ..	—	—	—	150
$(\text{PO}_4)_2\text{CaH}_4$, H_2O	—	—	—	53
CaCl_2 , 6 H_2O	—	—	—	111
SO_4K_2	—	—	—	185
Concentrations exprimées en milligrammes par litre.				
NO_3^-	5,47	15	4,23	8,04
PO_4H_2^-	0,92	1	2,2	0,84
SO_4^{--}	0,51	2	1,8	1,61
Ca^{++}	2,1	5	2,12	3,40
Mg^{++}	0,51	2	1,8	0,51
K^+	2,16	6	6,22	2,2
Cl^-	—	—	4,02	0,51
Na^+	—	—	—	6,2
Concentrations exprimées en milli-ions/gramme par litre.				

quand, arrivée à la fin de notre travail, nous proposerons une formule de solution mieux adaptée à la croissance du sporophyte à laquelle nos recherches ont abouti.

CHAPITRE PREMIER

TECHNIQUES

1° Techniques de culture du sporophyte.

A. — OBTENTION DU SPOROPHYTE A PARTIR DU SPOROCARPE.

La culture *in vitro* du sporophyte de *M. d.* est obtenue suivant la technique décrite par ALLSOPP [6] : le sporocarpe, aseptisé au chlorure de chaux à 5 p. 100, estensemencé sur un milieu nutritif approprié. Libérées par sa déhiscence, les mégaspores fécondées donnent naissance à des plantules dont on suit le développement et qu'on peut multiplier indéfiniment par sectionnement de leur rhizome : chaque fragment sectionné (ou *explantat*) redonne rapidement un sporophyte entier. Les cultures de *M. d.* utilisées au cours de ces recherches proviennent toutes d'un même sporocarpeensemencé au mois de novembre 1954 (1).

B. — TECHNIQUES DE MULTIPLICATION INDÉFINIE DES CULTURES.

La fragmentation du jeune sporophyte et, plus tard, des sporophytes issus de sa multiplication est opérée comme le montre la *figure 1* : les feuilles et les racines sont sectionnées à 1 cm environ du rhizome. Celui-ci est alors coupé en trois ou quatre tronçons (« explantats ») comprenant chacun deux bourgeons latéraux BL (explantats médian et basaux, M, B et B'), à l'exception de l'explantat apical A qui porte le bourgeon terminal BT et un bourgeon latéral BL. Déposé dans un tube de culture contenant un milieu nutritif convenable, l'explantat reforme rapidement une plante entière qui, suivant la même technique, pourra être multipliée.

Le *repiquage* des cultures, c'est-à-dire leur fragmentation en explantats, est effectué à intervalles réguliers, tous les quarante-cinq ou soixante jours. Nous appellerons *passage* sur tel ou tel milieu nutritif la période comprise entre deux repiquages successifs.

Pour l'entretien de la *souche*, c'est-à-dire des sporophytes cultivés sur le milieu témoin, l'ensemencement des explantats (généralement quatre) a lieu tous les deux mois.

(1) Les sporocarpes de *M. d.* ont été récoltés par le docteur M. D. LINDALE, directeur du Jardin Botanique de Sydney (Australie), que nous remercions ici.



FIG. 1. — Préparation du sporophyte témoin de *M. d.* en vue de son repiquage ($\times 0,8$)
 Les explantats apical *A*, médian *M* et basaux *B* et *B'* sont prêts à être ensemencés.
BT, bourgeon terminal; *BL*, emplacement des bourgeons latéraux.

Le repiquage des cultures expérimentales, c'est-à-dire des sporophytes soumis à différentes conditions nutritives précises, s'effectue tous les quarante-cinq jours. Seuls les explantats A, M et B ont été utilisés.

Dans le texte, le symbole Rx se rapporte à des cultures qui ont subi x repiquages successifs.

Il aurait été plus commode d'utiliser des explantats comprenant un seul nœud du rhizome de la culture à multiplier, c'est-à-dire un seul bourgeon méristématique : une telle pratique aurait présenté l'avantage de nécessiter un moins grand nombre de souches. Mais l'expérience a montré que les conditions de culture de l'explantat apical A se seraient trouvées différentes de celles des autres fragments. L'absence d'organes suffisamment développés, entraînant l'absence d'aérenchyme, n'assure plus sa flottabilité. Au moment du repiquage, il tombe au fond du tube de culture alors que les autres explantats restent à proximité de la surface du milieu nutritif.

C. — MILIEUX DE CULTURE.

1^o Milieu témoin ou milieu de référence. — Le milieu témoin utilisé a toujours été la solution de Knop diluée de son volume d'eau, additionnée de glucose (3 p. 100) et de solution à oligo-éléments de BERTHELOT modifiée par GAUTHERET [82] (cinq gouttes par litre). La composition saline de ce milieu est indiquée dans l'historique (tableaux I et I bis).

2^o Autres milieux. — Pour étudier l'action sur le développement du sporophyte des divers ions présents dans le milieu de référence (cations : Ca^{++} , Mg^{++} , K^{+} ; anions : NO_3^{-} , SO_4^{-} , $\text{PO}_4\text{H}_2^{-}$), nous avons toujours utilisé le milieu précédent auquel ont été substitués ou adjoints des sels à des concentrations variables. L'équilibre ionique est assuré au moyen de sels constitués, d'une part, par le cation ou l'anion considérés, d'autre part, par les ions Na^{+} et Cl^{-} qui jouent le rôle d'ions accompagnateurs.

a. *Milieux carencés.* — Pour l'étude des carences cationiques, le sel du cation est remplacé, en équivalence, par le sel correspondant de sodium.

Pour l'étude des carences anioniques, les solutions salines sont privées de leurs ions négatifs, les cations auxquels ils sont associés étant introduits sous forme de chlorures.

b. *Variations de la concentration en un macroélément.* — Les modifications de la concentration en un cation ont été provoquées par addition des chlorures équivalents, soit au milieu dépourvu de l'ion considéré pour les concentrations plus faibles que celles présentes dans le milieu témoin, soit à ce dernier pour les concentrations plus élevées.

Les variations de la teneur en anions ont, suivant le même procédé, été rendues possibles par des additions convenables des sels de sodium, soit au milieu carencé, soit au milieu de référence.

Les concentrations en ions seront données en *milli-molécules-grammes* (en abrégé : mM) ou en *milli-ions-grammes* (en abrégé : mI) par litre.

L'addition d'une forte concentration de glucose permet de ne pas tenir compte des modifications de la pression osmotique des milieux composés.

L'action de certaines substances telles que l'acide indol- β -acétique (AIA), la coumarine, l'acide 2-3-5-tri-iodobenzoïque (ATIB) et l'hydrazide maléique (HM) a été étudiée, dans des cas particuliers. Ces composés ont été ajoutés, aux concentrations désirées, dans les milieux de culture glucosés, avant la stérilisation à l'autoclave.

D. — PRÉCISIONS SUR LES CONDITIONS DANS LESQUELLES S'EFFECTUE LE DÉVELOPPEMENT DES SPOROPHYTES.

Les explantats sont déposés aseptiquement dans des tubes de verre ordinaire de grande taille (diamètre : 3,2 cm ; hauteur : 18 cm) contenant 50 cm³ de milieu nutritif rendu stérile par autoclavage pendant vingt minutes à 115° C. Le pH de ces milieux se trouve toujours compris entre 4 et 4,5 et n'a pas besoin d'être réajusté après stérilisation.

Les paniers de vingt-quatre tubes, aussitôt après l'ensemencement, sont placés dans une serre vitrée tournée vers le nord et maintenue à 25° C environ.

2° *Techniques d'observation des sporophytes.*

Sur chaque milieu expérimenté, douze explantats de *M. d.* sont mis en culture. Au bout de quarante-cinq jours, les sporophytes issus de leur développement sont observés du point de vue de leur morphologie et de leur accroissement pondéral. Cette étude, au cours des trois premiers passages, porte sur huit d'entre eux, les quatre autres servant aux ensemencements ultérieurs. Ce n'est qu'à la fin du quatrième passage que les douze sporophytes sont soumis à une observation comprenant une étude qualitative macro et microscopique et une étude quantitative. Les résultats numériques fournis par cette dernière ont été estimés par les méthodes statistiques courantes. Les observations ont eu lieu le plus souvent à l'œil nu et, dans des cas spéciaux, sous la loupe binoculaire (dénombrement des organes à l'état d'ébauches et degré de leur développement).

3° *Techniques analytiques.*

L'observation des cultures a parfois nécessité l'emploi de techniques plus particulières. Aucune de celles-ci n'étant originale, nous les décrirons rapidement.

A. — DÉTERMINATION DU POIDS FRAIS ET DU POIDS SEC.

Les sporophytes de quarante-cinq jours, sortis des tubes de culture, sont essorés entre deux feuilles de papier-filtre et pesés. La détermination du poids frais ne tient pas compte du poids initial de l'explantat, toujours très faible (il varie en effet entre 10 et 20 mg). Des expériences qui seront décrites plus loin ont montré qu'il pouvait être négligé. La valeur du poids frais obtenue représente donc l'accroissement pondéral du sporophyte en quarante-cinq jours.

La dessiccation des tissus n'appelle pas de commentaires spéciaux. Elle a été effectuée dans une étuve à 90° et durait deux jours. Toutes précautions d'usage ont été prises au moment de la pesée.

B. — TECHNIQUES DE DOSAGES.

1° Dosage du calcium. — Le dosage du calcium est effectué par complexométrie (DREVON-HORNER [68, 69, 104]).

Le calcium présent dans les tissus est extrait par macération du matériel végétal sec dans HCl N pendant vingt-quatre heures. On effectue la précipitation du calcium par l'oxalate d'ammonium. Après centrifugation, l'oxalate de calcium précipité est lavé et dissous par HCl concentré. La solution calcique acidulée est alors ajustée à pH 12 par NaOH 8 N et additionnée de murexide. Le complexon (acide éthylènediaminetétracétique) en solution titrée est versé jusqu'au virage au violet de l'indicateur coloré.

2° Dosage des tanins. — Les tanins sont extraits par l'eau à l'ébullition. La solution est traitée à chaud par un mélange ammoniacozincique qui précipite les tanins. Le précipité est dissous par l'acide sulfurique concentré. On procède alors au dosage de la solution tannique par manganimétrie.

3° Dosage de l'azote. — Le dosage des diverses fractions d'azote (azote total, minéral et organique, azote soluble total et azote protéique) a été effectué selon les méthodes habituelles. Après séparation des formes solubles et insolubles par macération dans l'alcool éthylique à 75 p. 100, on procède à la kjeldalisation, puis à la distillation dans l'appareil de Parnass et Wagner. Pour chaque fraction azotée, les valeurs données sont la moyenne de trois dosages.

C. — DÉTERMINATION DU CONTENU AUXINIQUE.

Les méthodes de détermination du contenu auxinique par chromatographie sur papier sont très nombreuses et peuvent varier sur un grand

nombre de points. Nous n'avons pas cherché à faire une étude critique des différentes étapes aboutissant à la mise en évidence des facteurs de croissance. Nous avons opté pour une méthode relativement simple et nous y sommes maintenue dès que nous avons pu vérifier qu'elle donnait des résultats constants avec des sporophytes témoins en tous points comparables.

1^{re} Préparation du matériel végétal et solvant d'extraction. La préparation des extraits est faite suivant les méthodes préconisées par KEFFORD [112].

Le solvant d'extraction est l'acétate d'éthyle.

Les cultures de *M. d.*, abondamment lavées à l'eau distillée, sont pesées et jetées dans l'eau bouillante où elles séjournent trois minutes. Cette opération a pour but de détruire les systèmes enzymatiques susceptibles de dégrader les différentes « auxines » présentes dans les tissus. Cette méthode a été critiquée [189-202] et rendue responsable de la formation d'inhibiteurs au point de départ du chromatogramme [151]. Aussi avons-nous parfois plongé directement les sporophytes, essorés et pesés, dans l'acétate d'éthyle glacé.

Le matériel végétal finement homogénéisé est soumis à l'extraction par le solvant. Effectuée en trois fois, à 0° C, elle dure quatre heures. Les trois fractions acétylées obtenues sont réunies et constituent l'extrait brut.

2^{de} Préparation de la fraction acide des extraits. De l'extrait brut contenant les auxines dites libres, on isole la fraction acide, suivant la méthode la plus couramment utilisée [144-145].

A l'extrait brut, on ajoute une solution de bicarbonate de sodium à 5 p. 100. Les auxines acides passent dans la phase bicarbonatée d'où elles sont alors reprises par de l'acétate d'éthyle frais. On procède alors à la réduction de la phase acétylée jusqu'à l'obtention d'un volume de 0,5 cm³. La fraction acide réduite n'a pas été purifiée bien qu'elle contienne diverses substances colorées.

3^{de} Chromatographie des extraits acides. La chromatographie en voie descendante de la fraction acide des extraits et des solutions alcooliques d'ALA synthétique est pratiquée sur des bandes larges de 3 cm prélevées sur des feuilles de papier Whatman n° 1. Le solvant utilisé est constitué par un mélange d'alcool isopropylique (10 volumes), d'ammoniaque à 28 p. 100 (1 volume) et d'eau déionisée (1 volume). Après équilibration de quatorze heures, le solvant est mis en contact avec le chromatogramme. La migration dure environ huit heures, temps qui correspond à un parcours de 25 cm du front de solvant, à 25° C et à l'obscurité.

4^{de} Étude du chromatogramme. Aussitôt après séchage à température très modérée, les bandes correspondant aux différents extraits sont soumises aux observations suivantes :

I. EXAMEN EN LUMIÈRE ULTRAVIOLETTE. — Les bandes examinées en lumière U. V. (2660 Å) présentent des zones de diverses fluorescences qui sont notées, bien que le taux de fluorescence soit rarement corrélatif de l'activité des différentes substances présentes [153]. Nous n'avons effectué cette étude que pour nous assurer que des corps comme la scopoletine [150-151] n'interviennent pas dans les extraits. Cet examen permet au moins de déterminer avec sûreté le front de solvant qui est toujours marqué par une ligne bleutée.

II. RÉVÉLATION PAR DIFFÉRENTS RÉACTIFS. — a. *Révélation par le réactif de Salkowski modifié par GORDON et WEBER* [90].

Le réactif est obtenu en ajoutant à 100 cm³ d'acide perchlorique à 35 p. 100, 270 mg de chlorure ferrique et 100 cm³ d'alcool éthylique à 95°. Vaporisé sur les bandes de papier chromatographique, il permet la mise en évidence des noyaux indoliques présents dans les extraits ainsi que la détermination exacte du R_f de l'AIA synthétique.

b. *Révélation par la benzidine diazotée*. — La recherche des groupements phénoliques est effectuée par *azoréaction* [42].

Le réactif se prépare extemporanément en ajoutant à 50 cm³ d'HCl à 8 p. 100 200 mg de benzidine et 5 cm³ d'une solution aqueuse de nitrite de sodium à 5 p. 100. La vaporisation de ce réactif sur le chromatogramme est suivie de l'application d'une solution aqueuse concentrée de carbonate de sodium (à 20 p. 100), la réaction ne pouvant s'effectuer qu'en milieu alcalin.

Les composés phénoliques se colorent en orange, rouge ou pourpre.

c. *Révélation par la ninhydrine*. — La recherche des groupements aminés a été effectuée au moyen d'une solution éthanolique à 0,1 p. 100 de ninhydrine.

d. *Révélation par l'acide phtalique aniliné*. — Les sucres ont été recherchés par vaporisation sur le chromatogramme d'une solution, dans du butanol saturé d'eau (100 cm³), d'acide phtalique (1,66 g) et d'aniline fraîche (0,75 cm³).

III. TESTS BIOLOGIQUES. — Ils sont pratiqués sur d'autres bandes obtenues en même temps que celles qui ont été soumises aux manipulations décrites précédemment. Chaque bande correspondant à un extrait donné est découpée en carrés (ou « aires ») de 2,5 × 2,5 cm. Chaque carré est alors mis en contact avec le matériel végétal choisi comme test.

Deux tests biologiques de mise en évidence des substances actives contenues dans les extraits ont été utilisés, l'un basé sur l'élongation de sections de coléoptiles d'avoine (*Test Avoine*), l'autre sur le développement d'explantats de *M. d.* (*Test Marsilea*).

a. *Test Avoine*. — La préparation de ce test a fait l'objet de recherches détaillées et critiques [27, 28, 146]. Les coléoptiles rectilignes, nés de la germination de grains d'avoine Victoire des Établissements Ringot, ne mesurent pas plus de 2 à 2,5 cm. Les sections effectuées mécaniquement, à partir d'une distance de 3 mm de la pointe, mesurent 5 mm. Dans un godet contenant 2 cm³ d'eau déionisée additionnée de saccharose (2 p. 100) et d'un tampon phosphate à pH 5 (formule de Nitsch [146]) sont déposés chaque carré de papier chromatographique à tester et dix sections de coléoptiles. Des sections *contrôles* reçoivent, dans les mêmes conditions, un carré de papier découpé dans la partie supérieure du chromatogramme. Au bout de vingt heures passées à l'obscurité et à 25° C, elles sont toutes mesurées à l'aide d'un agrandisseur photographique ($\times 6$). Une série de calculs a permis de conclure qu'une différence de 5 p. 100 au maximum des pourcentages de l'allongement relatif des sections « test » par rapport à celui des sections « contrôles » est significative et met en évidence soit un activateur, soit un inhibiteur.

b. *Test Marsilea*. — Le test Avoine est le plus couramment employé, mais PILET remarquait récemment [156] « qu'il est normal d'utiliser comme test biologique le matériel dont on a effectué l'extrait et dont on désire connaître le contenu hormonal ». Pourtant, à l'exception de ceux de LEXANDER [123], PHILLIPS et WAREING [153] et de TORREY [197], nous n'avons pas trouvé de travaux tenant compte d'une telle constatation. Aussi avons-nous mis au point le test *Marsilea*, basé sur le développement d'explantats prélevés sur des sporophytes selon la technique habituelle. Chaque carré du chromatogramme est déposé dans un tube de culture contenant 35 ou 50 cm³ de milieu témoin. On procède alors à l'ensemencement des milieux. Au bout de quarante-cinq jours, le plant qui dérive de l'explantat est observé et pesé. Les résultats sont traduits par un histogramme établi en fonction du Rf du carré de papier chromatographique ayant reçu l'extrait et du pourcentage d'accroissement pondéral des cultures en quarante-cinq jours, rapporté à la valeur donnée par les contrôles.

Ce test appelle quelques remarques :

Puisque les bandes de papier comprenant l'extrait sont stérilisées avec le milieu où se développent les sporophytes, le test ne permettra la mise en évidence que des substances qui résistent à des températures de 115° C.

Les explantats, pour leur croissance, étant placés dans une serre vitrée bien éclairée, seules les substances photo-stables dans ces conditions pourront être détectées.

Il n'est pas à l'abri de toutes critiques : aucune analyse statistique de croissance ne pourra être effectuée puisque l'on ne dispose que d'une seule culture par fraction testée. Seules, de grosses modifications de l'aspect ou du poids des sporophytes traduiront la présence d'une substance active dans l'extrait étudié.

4^o *Techniques histologiques.*

A. — ANATOMIE DU RHIZOME.

Les modifications anatomiques du rhizome ont été étudiées sur des coupes transversales faites à main levée, au niveau des six premiers entrenœuds visibles à l'œil nu et comptés à partir de l'apex. Ces coupes ont été colorées par le mélange carmin-vert d'iode.

B. — HISTOLOGIE DE L'APEX.

Les apex prélevés sur des sporophytes de quarante-cinq jours, ont été fixés le même jour, à la même heure. Les deux fixateurs employés sont le liquide de Helly ou le mélange alcool-formol-acide acétique (67 cm³ de formol à 30 p. 100, 23 cm³ d'acide acétique glacial, 500 cm³ d'alcool éthylique à 95°, eau en quantité suffisante pour 1 litre).

Le Helly, plus favorable à l'étude cytologique des cellules, a été employé pour l'observation des noyaux. En outre, par le bichromate de potassium qu'il contient, il précipite les tanins renfermés dans les vacuoles, permettant ainsi leur examen comparatif dans les tissus des sporophytes témoins et expérimentaux. Le deuxième fixateur, bien que de réputation médiocre, convient particulièrement à l'étude histologique des régions méristématiques étudiées.

Les coupes longitudinales médianes passant par le plan de symétrie de l'organe, épaisses de 5 à 7 μ , ont été colorées par l'hématoxyline de Regaud ou soumises à la réaction nucléale de Feulgen.

L'obtention des coupes est relativement aisée dans le matériel témoin. Par contre, de nombreuses difficultés se sont présentées pour celles pratiquées dans les apex plus ou moins nécrosés des cultures aberrantes qui ont tout particulièrement retenu notre attention : les parois cellulaires épaissies et cassantes se déchiquettent sous le rasoir du microtome, et les coupes se défilent mal au moment de leur collage sur lame.

Quelques mises en évidence cytochimiques ont été pratiquées. L'amidon a été coloré par le réactif iodo-ioduré et observé sur des coupes épaisses de 5 μ . Les lipides, colorés par le rouge Soudan III en solution alcoolique, ont été examinés sur des coupes fines pratiquées dans du matériel végétal frais.

CHAPITRE II

EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES

Avant d'exposer les résultats des recherches entreprises pour déterminer le rôle des macro-éléments sur le développement du sporophyte de *Marsilea*, il est naturel de décrire la culture témoin, tant du point de vue morphologique qu'anatomique, et d'exposer les recherches préliminaires dont elle a été l'objet.

1^o Description du sporophyte témoin.

A. — LA JEUNE PLANTULE.

La jeune plantule (fig. 2) a longuement été décrite par ALLSOPP [6 à 14] et TOURNAY [198]. Nous avons pu à notre tour l'observer. Elle présente une tige à croissance horizontale ou rhizome dont l'apex est recourbé vers

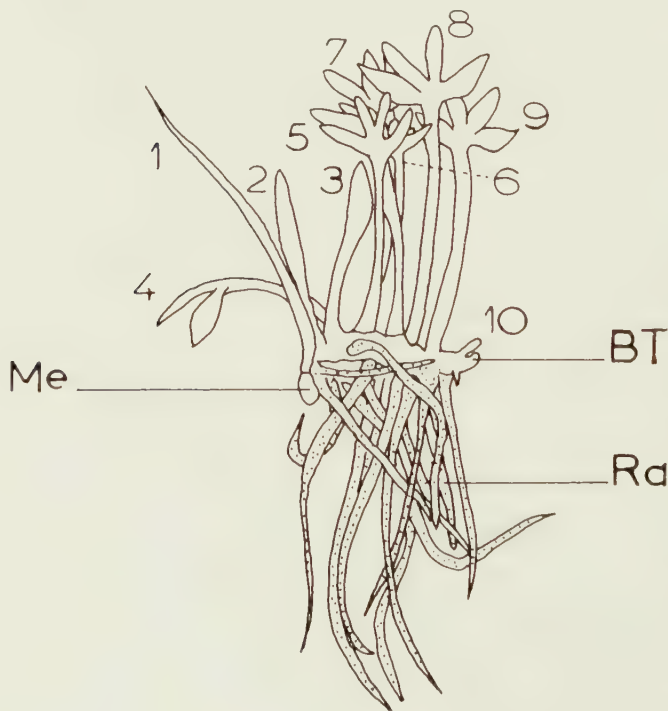


FIG. 2. — Aspect morphologique d'une jeune plantule de *M. d.* ($\times 4,2$). (D'après ALLSOPP, *Annals of Botany*.)

On notera la forme des feuilles successivement formées sur le rhizome : la première (1) est aciculée ; les deux suivantes (2 et 3) sont spatulées ; la quatrième (4) est bifide. Viennent ensuite des feuilles quadrifides palmées (5 à 9). La dernière (10) est encore enroulée en crosse.

Me, mégaspore fécondée ; *Ra*, racine ; *BT*, bourgeon terminal.

Les bourgeons latéraux, trop petits, ne sont pas visibles.

sa face supérieure ou dorsale et fait un angle de près de 90° avec l'axe. Cet apex, fortement dorsi-ventral, donne naissance du côté dorsal aux

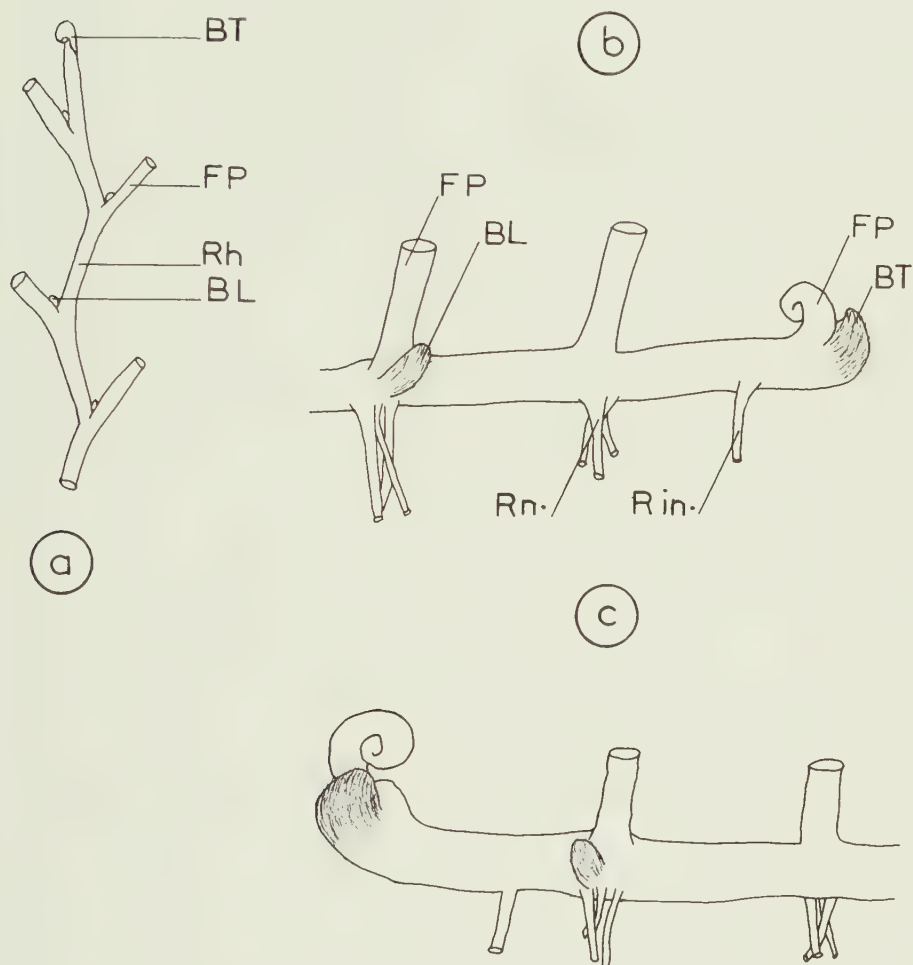


FIG. 3. — Sporophyte témoin observé sous divers angles.

a : vue dorsale. — *b* : vue latérale droite du rhizome. — *c* : vue latérale gauche du rhizome.
Rh, rhizome principal; *FP*, feuille principale; *Rn*, racine nodale; *Rin*, racine internodale
BT, bourgeon terminal; *BL*, bourgeon latéral.

En *a*, l'apex *BT* est placé sous la plus jeune feuille visible.

feuilles et du côté ventral aux racines. Le rhizome porte des nœuds plus ou moins espacés où sont insérées une feuille et généralement trois racines. Il n'est pas rare, cependant, de trouver des racines internodales. Au niveau de chaque nœud, le rhizome est légèrement coudé, d'où son aspect en zigzag plus ou moins étalé (fig. 3 *a*). A la base de chacune des feuilles et placé du côté de sa face externe ou dorsale se trouve un bourgeon latéral



FIG. 4. — Aspects morphologiques du sporophyte de *M. d.* ($\times 0,8$).

a : culture d'été. — En *Y*, on remarquera la présence d'une feuille quadrifide qui n'a pas achevé son développement et, en *X*, une feuille quadrifide et une feuille en crosse qui ne se sont pas développées.

b : culture d'hiver. — Les feuilles quadrifides palmées proches de l'explantat (en *X*) sont nettement visibles. Les plus grandes feuilles ne présentent pas de larges folioles épanouies.

Ex, explantat. — *BT*, bourgeon terminal ; *FE*, feuille quadrifide épanouie ; *Eb*, ébauche de rhizome due au fonctionnement du bourgeon latéral très rapidement inhibé par le développement du rhizome dominant.

en position extra-axillaire, légèrement déporté vers l'apex principal de l'axe. Ces bourgeons sont normalement inhibés dans leur développement par l'apex dominant. Sur le rhizome, les feuilles et leurs bourgeons sont placés suivant deux rangées latérales, alternativement à droite et à gauche, comme le montrent les figures 3 et 5.

Le *Marsilea drummondii*, comme beaucoup d'autres Fougères et plantes supérieures, porte des feuilles « juvéniles » morphologiquement différentes des feuilles « adultes ». Il a donc un *développement hétéroblastique* suivant la terminologie de GÆBEL [88] (1). La première feuille formée est totale-



FIG. 5. — Rhizome du sporophyte représenté figure 4, a ($\times 2$).

Les bourgeons latéraux *latents* portés par le rhizome ne sont pas visibles par suite de leur exigüité. BL, emplacement des bourgeons latéraux ; Rh, rhizome dominant ; Eb, ébauche du rhizome.

ment dépourvue de limbe (fig. 2 : 1), les feuilles suivantes sont successivement spatulées (fig. 2 : 2 et 3), puis bifides (fig. 2 : 4) et les feuilles dites adultes (fig. 2 : 5 à 10) sont quadrifides.

Chez les jeunes plantules, les feuilles présentent un pétiole court, quel que soit le nombre de leurs folioles.

B. — LE SPOROPHYTE EN CULTURE ILLIMITÉE.

Le sporophyte, issu du développement d'un explantat tel que nous l'utilisons, diffère de la jeune plantule : il est d'emblée *physiologiquement adulte* par ce fait qu'il porte uniquement des feuilles quadrifides (fig. 4, a et b). La forme de celles-ci retiendra un moment l'attention : comme nous pourrions nous en assurer à maintes occasions au cours de ces recherches, ce sera là un caractère de grande importance interprétative, la feuille étant l'organe qui révèle le mieux l'état métabolique du sporophyte considéré dans son ensemble. Les feuilles les premières formées,

(1) Il convient dès maintenant de noter que le déterminisme du développement hétéroblastique est mal connu. Pour GÆBEL, les premières feuilles formées, de type juvénile, sont potentiellement semblables aux feuilles adultes, mais sont arrêtées très tôt dans leur développement, arrêt provoqué sans doute par des conditions nutritives inadéquates. Plus récemment ont paru les études critiques de ASHBY [18-19], ainsi qu'un long travail de BINET [31], qui analysent les causes possibles de ce phénomène et résument les connaissances actuelles sur ce sujet : l'hétéroblastie d'un végétal serait sous l'étroite dépendance de nombreux facteurs : conditions environnantes, physiques et nutritives, dans lesquelles il est maintenu ; facteurs internes de nature inconnue, peut-être hormonale ; facteurs génétiques ou facteurs liés au vieillissement de la plante, selon son *physiological ageing*. Nous aurons l'occasion de discuter de la validité de ces hypothèses.

c'est-à-dire les plus voisines de l'explantat, présentent un pétiole plus ou moins court terminé par quatre folioles petites, enroulées en crosse ou bien palmées [situées dans des plans parallèles et verticaux (X, fig. 4, *a* et *b*)]. Ensuite apparaissent des feuilles de plus en plus longuement pétiolées (le pétiole peut mesurer jusqu'à 15 cm), portant quatre folioles largement épanouies [disposées dans un plan horizontal (FE, fig. 4 *a*)]. Près de l'apex, les folioles des feuilles les dernières formées sont du même type que les précédentes, mais n'ont pas atteint leur plus haut degré de maturation : les quatre folioles sont appliquées les unes contre les autres (Y, fig. 4 *a*). A l'apex, on observe à l'œil nu une jeune feuille encore enroulée en forme de crosse qui, observée à la loupe, est quadrifide.

Chez le sporophyte de *M. d.*, une telle « quadrifidie » foliaire caractérise la forme adulte, et l'on peut dire que la feuille adulte qui a atteint son plus haut degré de croissance est celle qui présente quatre folioles épanouies.

A titre d'exemple, voici la composition foliaire moyenne de sporophytes de quarante-cinq jours (vingt-sixième repiquage, cultures d'été) : l'apex initie en moyenne dix feuilles ; les quatre premières sont petites, généralement palmées, les quatre suivantes sont de grandes feuilles épanouies et les deux dernières sont en voie de développement.

La présence de ces différents types foliaires appelle quelques remarques :

1° Dans la région proche de l'explantat, la présence de feuilles quadrifides palmées ou enroulées en crosse, de petite taille, peut s'expliquer peut-être par le fait qu'elles ont pris naissance peu après le repiquage : la plante, après le choc opératoire que constitue sa fragmentation, n'a vraisemblablement pas repris son équilibre. Il est important de noter qu'elles ont perdu la possibilité de se développer ultérieurement : on peut laisser la plante qui les porte plus longtemps dans le même milieu nutritif ou la transplanter entière sur un milieu neuf, ces feuilles garderont leur taille et leur forme et, plus tard, se faneront sous l'aspect qu'elles présentaient au bout de quarante-cinq jours. Point capital en ce qu'il montre indirectement qu'une feuille palmée ou enroulée en crosse — c'est-à-dire sous-développée si on la compare aux grandes feuilles épanouies, — initiée depuis longtemps par l'apex, a perdu ses caractères méristématiques, c'est-à-dire la faculté de subir des mitoses d'élargissement et d'allongement.

2° Le développement foliaire est sous la dépendance, entre autres facteurs, des saisons : les cultures d'été (fig. 4 *a*) présentent des feuilles épanouies plus nombreuses que les cultures d'hiver (fig. 4, *b*). Seul le degré d'épanouissement des folioles est modifié : en effet, été comme hiver, les sporophytes portent en moyenne le même nombre de feuilles, et la longueur moyenne des pétioles est sensiblement égale. Comme nous l'avons noté précédemment, ces feuilles ne peuvent s'épanouir et se fanent, même lors d'une prolongation de culture.

Très différent de la jeune plantule par la forme et le développement

des feuilles, le sporophyte « physiologiquement adulte » obtenu en culture illimitée présente, par ailleurs, la même structure morphologique générale. Comme le système foliaire, le système racinaire y est aussi plus développé. Près de l'explantat et près de l'apex, les racines sont plus courtes que dans la région médiane du rhizome. Le rhizome et les feuilles sont chlorophylliens. Les bourgeons méristématiques, qu'ils soient apicaux ou latéraux, sont velus et souvent d'un vert plus clair que les autres parties de la plante. Les racines localisées dans la région basale sont légèrement brunâtres.

2° Mode de développement de l'explantat.

L'explantat a été décrit dans la première partie : on sait qu'il comprend soit un bourgeon apical et un bourgeon latéral (A, fig. 1), soit deux bourgeons latéraux (M et B, fig. 1). Ensemencés sur le milieu témoin, ces deux sortes d'explantats se développent de façon un peu différente :

— le sporophyte né de l'explantat apical A provient uniquement de l'activité de l'apex principal. Le deuxième bourgeon, qui est latéral, ne se développe pas, inhibé par l'apex dominant;

— les deux bourgeons latéraux des explantats médians et basaux M et B entrent simultanément en activité dès qu'ils ne sont plus soumis à l'influence de l'apex principal : le bourgeon le plus proche de celui-ci se développe et fournira la nouvelle culture. Il devient à son tour tout-puissant et inhibe le développement de l'autre. Les figures 4 *b* et 5 montrent le rhizome formé par le bourgeon extra-axillaire dominant et, en Eb, l'ébauche de rhizome provenant de l'autre bourgeon avant qu'il ne soit inhibé. On remarquera que les rhizomes néo-formés, arrêtés dans leur croissance, portent seulement des feuilles quadrifides palmées, faiblement pétiolées.

3° Étude comparative de l'homogénéité de croissance des différents explantats.

La première question à laquelle il fallait répondre découle du mode de multiplication de la souche adopté : la croissance des explantats A, M et B est-elle la même en quarante-cinq jours ? Les nouveaux explantats obtenus par fragmentation des sporophytes néoformés à partir du développement de A, M et B (voir fig. 6) donnent-ils des plants à croissance homogène ?

1° Modalités de croissance des explantats A, M et B. — Vingt-quatre explantats sont obtenus par fragmentation de huit souches ; huit explantats sont basaux, huit médians et huit apicaux. Les sporophytes qui en

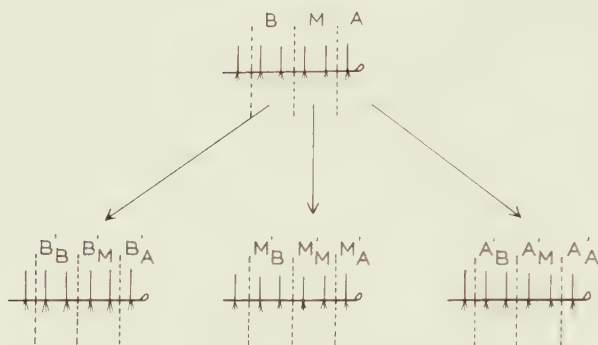


FIG. 6. — Schéma indiquant le mode de multiplication d'une culture souche au cours de deux repiquages successifs.

Au premier repiquage, la souche fournit les trois explantats A, M et B.

Au bout de quarante-cinq jours, les sporophytes issus de leur développement sont à leur tour fragmentés et donnent les explantats $B'A$, M, B , $M'A$, M, B , $A'A$, M, B .

proviennent sont étudiés du point de vue de leur accroissement pondéral, de l'élongation de leurs rhizome, racines et feuilles, ainsi que du nombre de ces dernières. L'expérience est répétée deux fois.

TABLEAU II. — INFLUENCE DE L'ORIGINE DE L'EXPLANTAT SUR LE POIDS FINAL DES SPOROPHYTES.

NUMÉRO de l'expérience.	EXPLANTAT basal.			EXPLANTAT médian.			EXPLANTAT apical.		
	P	P _i	P _s	P	P _i	P _s	P	P _i	P _s
1	330	285	375	358	305	411	332	285	379
2	318	246	390	314	254	374	315	228	402

P : poids final moyen (en milligrammes) ; P_i et P_s, limites inférieure et supérieure de la zone de sécurité de P (en milligrammes), avec 95 p. 100 de chances.

Noter que les faibles différences du poids final des différents sporophytes ne sont pas statistiquement significatives.

a. *Accroissement pondéral.* — Le tableau II montre qu'il n'y a pas de différences significatives dans le poids final des sporophytes de quarante-cinq jours, qu'ils soient issus d'un explantat apical, médian ou basal.

b. *Autres données quantitatives.* — De l'examen du tableau III, il ressort que les différentes variables mesurées sur des sporophytes dont l'origine est basale, médiane ou apicale, sont très homogènes. Les graphiques de

TABLEAU III. — INFLUENCE DE L'ORIGINE DE L'EXPLANTAT SUR LES DIFFÉRENTS CARACTÈRES QUANTITATIFS DES SPOROPHYTES.

VARIABLES mesurées.	CULTURES BASALES <i>n</i> = 7.			CULTURES MÉDIANES <i>n</i> = 8.			CULTURES APICALES <i>n</i> = 8.		
	mm ou unités.	σ	V	mm ou unités.	σ	V	mm ou unités.	σ	V
Longueur moyenne du rhizome (en mm)	12	3	25 %	15	3,9	26 %	16	4,7	29 %
Longueur moyenne des racines (en mm)	34,6	4,16	12 %	35,8	3,46	10 %	38,1	5,05	13 %
Nombre moyen des racines	20	1,85	9 %	21	3,46	16 %	20	3,69	18 %
Longueur moyenne des pétioles (en mm)	42	9,4	22 %	45	5,1	11 %	46	8,2	18 %
Nombre moyen des feuilles	7	0,17	2 %	7	0,94	13 %	7	0,5	7 %
<i>n</i> : nombre de cultures qui ont servi à l'établissement de la moyenne des variables envisagées. σ et V : écart type et coefficient de variation des variables mesurées.									

la figure 7 précisent d'autre part qu'aux différents nœuds du rhizome des sporophytes étudiés, l'élongation pétioleaire est la même quelle que soit l'origine de l'explantat dont ils dérivent.

2° Modalités de croissance des explantats A'AMB, M'AMB et B'AMB. — Dans un deuxième essai, les explantats ont été obtenus par fragmentation de souches d'origine précise : huit d'entre elles étaient d'origine apicale ; huit, médiane ; huit, basale. A partir des données numériques (tableau IV) portant sur le poids final des plants de quarante-cinq jours, les calculs ont montré que les sporophytes ne diffèrent pas entre eux quelle que soit leur origine. Les autres variables mesurées ont donné des résultats identiques à ceux de la première expérience : il n'y a donc pas lieu de les produire à nouveau.

EN RÉSUMÉ, le développement des explantats (et des plants qui en dérivent) est le même en quarante-cinq jours quelle que soit leur posi-

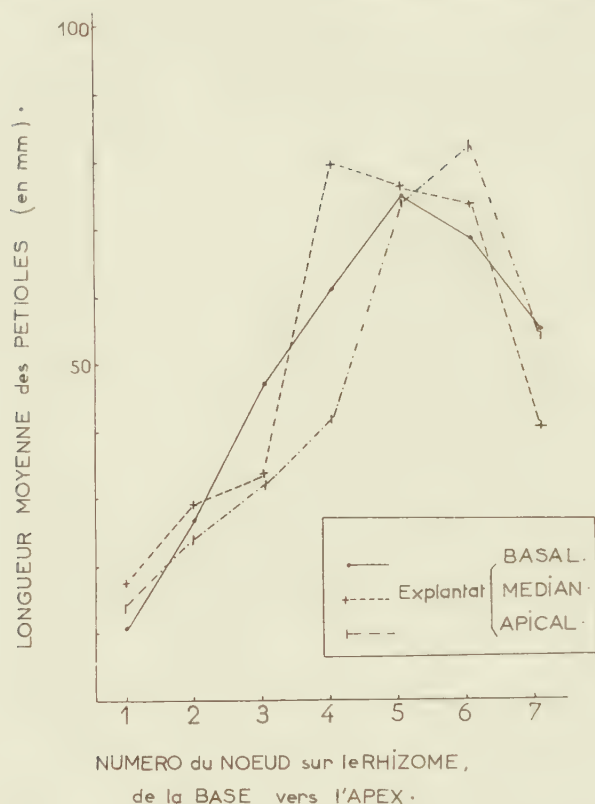


FIG. 7. — Influence de l'origine topographique des explantats sur l'élongation pétiole des sporophytes qui en dérivent.

La longueur moyenne des pétioles présents aux nœuds successifs du rhizome est calculée sur huit mesures.

Le parallélisme des courbes indique que l'origine de l'explantat ne modifie pas le caractère quantitatif envisagé.

TABEAU IV. — INFLUENCE DE L'ORIGINE DE LA CULTURE SOUCHE ET DES PLANTS QUI EN DÉRIVENT SUR L'ACCROISSEMENT PONDÉRAL EN QUARANTE-CINQ JOURS.

ORIGINE de la culture souche.	CULTURES BASALES B'.				CULTURES MÉDIANES M'.				CULTURES APICALES A'.			
	P	n	σP	V	P	n	σP	V	P	n	σP	V
Cultures basales B...	282	5	89	32 %	273	7	90	33 %	286	7	89	31 %
Cultures médianes M.	282	7	72	26 %	224	8	25	11 %	265	8	54	20 %
Cultures apicales A...	265	8	72	27 %	319	8	67	21 %	327	7	54	17 %

P : poids moyen en milligrammes ; n : nombre de cultures étudiées ; σP : écart type de P ; V : coefficient de variation de P. (Pour les lettres B, M, A et B', M' et A', voir figure 5.)

tion topographique sur la souche. Pour étudier les modalités de croissance du *Marsilea*, on peut utiliser indifféremment n'importe lequel des trois explantats obtenus par fragmentation des cultures souches.

4^o Choix d'un critère pondéral.

Le poids de l'explantat est toujours très faible (10 à 20 mg). Il a été indiqué dans la technique qu'il est négligé dans l'appréciation pondérale de la croissance. Est-ce légitime et n'influe-t-il pas sur le poids final des sporophytes ?

L'examen des données numériques fournies par quarante-huit cultures indique qu'il n'y a aucune corrélation entre le poids final des plants de *M. d.* et le poids initial des explantats, ce qui montre que ces deux variables sont indépendantes : les différences pondérales observées sur les explantats n'ont donc aucune influence sur les valeurs pondérales finales correspondantes. Cela permet d'omettre la pesée de l'explantat et de ne tenir compte que du poids final des cultures de quarante-cinq jours.

5^o Action du pH des solutions nutritives.

Afin de vérifier l'action du pH sur le développement du *Marsilea*, douze explantats ont été déposés dans des milieux dont le pH, pris avant la stérilisation à l'autoclave (1), varie de 3 à 8.

A la fin du premier passage, toutes les cultures sont normales, à l'exclusion de celles qui se sont développées sur le milieu le plus acide : quoique vivants, les sporophytes sont très chétifs et portent tous des racines très courtes et noires. A un degré nettement moindre, leurs feuilles sont, elles aussi, sous-développées et n'atteignent pas la forme épanouie.

A la fin du deuxième passage, sur la solution nutritive à pH 3, les explantats meurent sans avoir repris. Aux autres pH, les sporophytes sont tous vivants. Le tableau V groupe les valeurs de leur accroissement pondéral en quarante-cinq jours. De son examen, on conclut que le milieu à pH 4 permet la meilleure croissance. Au niveau des pH supérieurs à 4, elle est inhibée et les milieux, après autoclavage, présentent un abondant précipité.

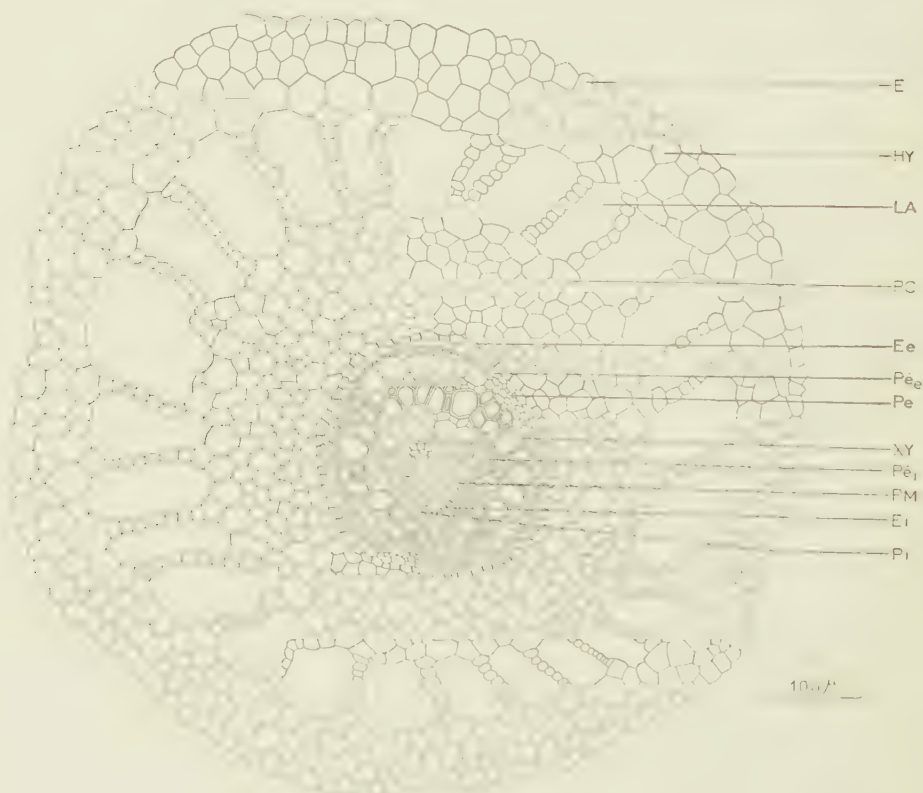
On notera que les sporophytes vivants ont tous tendance à neutraliser le milieu dans lequel ils se développent, quel que soit son pH initial. Cette étude, pour sommaire qu'elle soit, suffit à montrer que les milieux dont le pH initial est voisin de 4 sont favorables au développement de l'explantat. Aussi avons-nous toujours vérifié que les différentes solutions composées au cours de ce travail présentaient un pH initial très voisin de 4. D'autre part, l'explantat au cours de sa prolifération modifiant considé-

(1) Les résultats de I. Sossountzov [182], fournis par des colonies prothalliennes de *Gymnogramme calomelanos* en culture aseptique, ont montré qu'il n'est pas utile de procéder à un ajustement très précis du pH des milieux nutritifs au moment du repiquage, la stérilisation n'entraînant que de très faibles modifications, de l'ordre de quelques dixièmes d'unité.

TABLEAU V. — INFLUENCE DU *pH* INITIAL SUR L'ACCROISSEMENT PONDÉRAL DE 12 SPOROPHYTES DE DEUXIÈME PASSAGE.

	<i>pH</i> INITIAL.					
	3	4	5	6	7	8
Poids final (en mg)	—	475	361	349	260	232
<i>pH</i> final	3,5	7,1	7,2	7,2	7,3	7,2

ablement la valeur de celui-ci, il n'est pas nécessaire d'effectuer un ajustement précis du *pH* après la stérilisation.

FIG. 8. — Structure anatomique du rhizome de *M. d.*

Coupe transversale pratiquée au niveau du 4^e entre-nœud (voir explications dans le texte).

De l'extérieur vers l'intérieur, on observe : *E*, l'épiderme ; *HY*, l'hypoderme ; *LA*, les lacunes aërières de l'aérenchyme ; *PC*, le parenchyme cortical ; *Pée* et *Ee*, le péricycle et l'endoderme externes ; *Pe*, le phloème externe ; *XY*, le xylème ; *Pi*, le phloème externe ; *Pée* et *Ei*, le péricycle et l'endoderme internes ; *PM*, le parenchyme médullaire.

La stèle est une solénostèle amphiphloïque.

6° Structure anatomique du rhizome du sporophyte témoin.

Cette étude a été entreprise pour connaître la structure anatomique du rhizome et plus particulièrement de sa stèle, et pour déterminer à quel moment les trachéides sont toutes lignifiées. A cette fin, des coupes trans-

FIG. 9. — Schémas de coupes transversales pratiquées sur les rhizomes de *M. d.* cultivés dans le milieu témoin (de *a* à *e*) et en présence d'une forte concentration de chlorure de sodium (*f*).

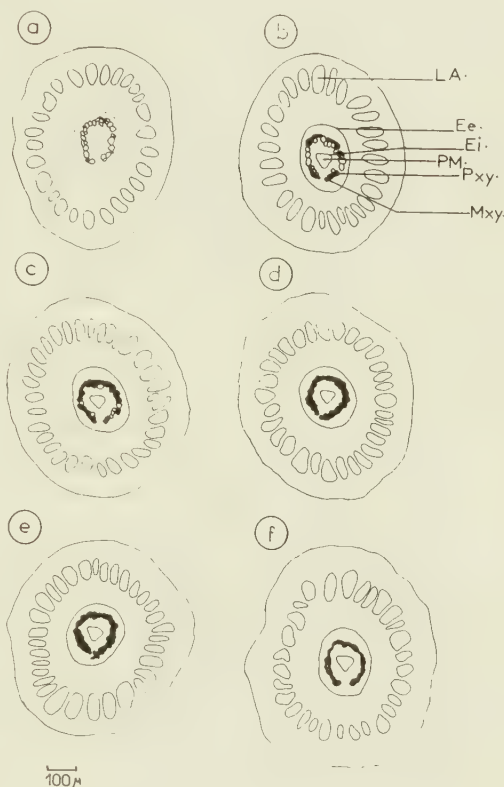
a, b, c, d : au niveau du 1^{er}, du 2^e, du 3^e et du 4^e entre-nœud. — *e* : au niveau du 6^e entre-nœud — *f* : au niveau du 4^e entre-nœud, en présence de 120 mM NaCl/l.

Comparer cette structure à celle du témoin (*d*).

LA, lacune aérifère de l'aérenchyme; PXY, protoxylème; MXY, métaxylème; Ee et Ei, endodermes externe et interne; PM, parenchyme médullaire.

Pour tous ces schémas, mêmes légendes que pour le schéma *b*.

En *a*, les deux endodermes ont été représentés en pointillé parce qu'ils ne comportent pas encore leur cadre subéro-lignifié.



versales ont été pratiquées dans le rhizome au niveau des six premiers entre-nœuds visibles à l'œil nu comptés à partir de l'apex principal.

La structure anatomique du rhizome de *Marsilea* a longtemps été décrite par TOURNAY [198], ESAU [73], SMITH [173]. Nous avons retrouvé cette même structure qu'illustrent les figures 8, 9 et 10 *d* sur des coupes pratiquées au niveau du quatrième entre-nœud. De l'extérieur vers l'intérieur, on observe l'épiderme, l'hypoderme, l'aérenchyme creusé de vastes lacunes aérifères, quelques assises de parenchyme cortical et l'endoderme externe à parois radiales subéro-lignifiées. La stèle proprement dite, définie par nos prédécesseurs comme étant une *solénostèle amphiphloïque*, est entourée par un péricycle externe et comprend des massifs de phloème externe (proto et métaphloème) noyés dans des cellules de parenchyme phloémien. Le protoxylème est réparti en cinq pôles exarches (peu visibles à ce niveau) et comporte quelques trachéides spiralées. Le métaxylème

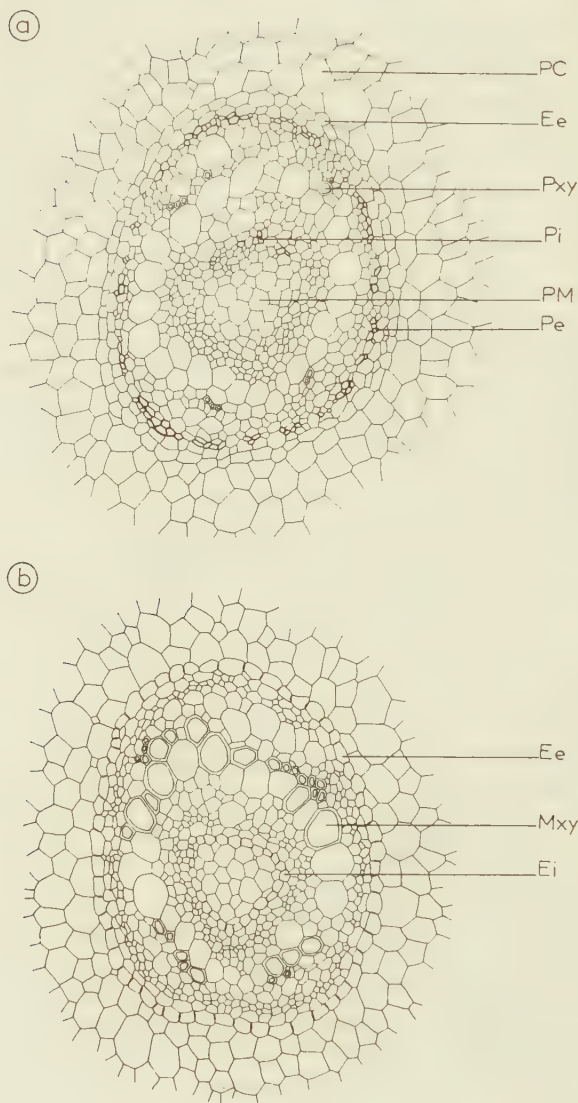


FIG. 10. — Structure stélisque des rhizomes de *M. d.* cultivés sur le milieu témoin ou en présence de 120 mM NaCl.

Voir les explications de *a*, *b*, *c*, *d*, *e* et *f* à la figure 9.

PC, parenchyme cortical; PE et PI, phloèmes externe et interne; Ee et Ei, endodermes externe et interne; PXY et MXY, proto- et métaxylème; PM, parenchyme médullaire.

constitués de très petites trachéides à parois lignifiées, sont entourés des futures trachéides scalariformes du métaxylème dont la paroi n'est pas encore épaissie par un dépôt de lignine.

est constitué de larges trachéides scalariformes disposées suivant une, très rarement deux, assises. Elles sont noyées dans du parenchyme xylémien. Presque au centre de la stèle, on observe du phloème interne, un péri-cycle et un endoderme internes au contour triangulaire, la base du triangle étant tournée vers la face dorsale du rhizome. Cette dernière assise délimite le parenchyme médullaire.

Les coupes pratiquées au niveau des six premiers entre-nœuds indiquent que la structure des tissus de l'écorce ne présente pas de modifications importantes (fig. 9, de *a* à *e*) quel que soit l'entre-nœud où la coupe a été faite; l'attention se portera donc exclusivement sur la structure stélisque (fig. 10, de *a* à *e*). Au niveau du premier entre-nœud (fig. 10 *a*), la stèle a déjà acquis sa taille définitive. Les endodermes ne présentent pas encore leurs épaississements lignifiés. Les massifs phloémiens sont intensément colorés en rose et leur paroi cellulaire est épaisse. Les cinq pôles de protoxylème (trois disposés du côté dorsal et deux du côté ventral du rhizome),

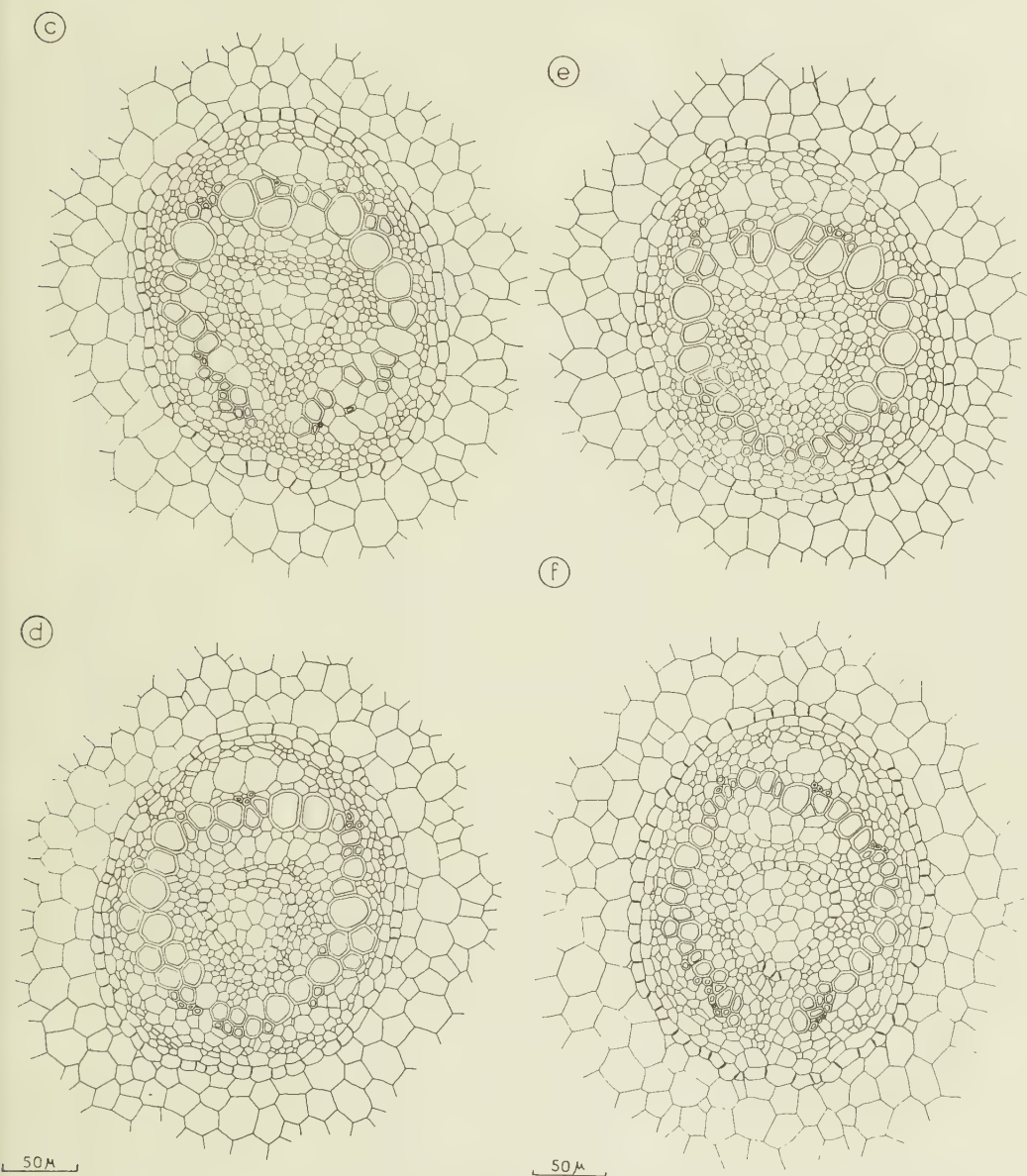


FIG. 10 (suite). — Les modifications provoquées par une forte dose de chlorure de sodium sont peu notables (comparer *d* et *f*).

Au niveau du deuxième entre-nœud (fig. 10 *b*), on assiste à la lignification des parois radiales des cellules des deux endodermes et de quelques éléments du métaxylème. Celle-ci se continue au niveau du troisième entre-nœud et n'est complète qu'au niveau du quatrième (fig. 10, *c* et *d*). Les figures 9 et 10 *e* montrent que, dans les entre-nœuds

suivants, la structure stélique ne présente pas de modifications notables*.

Le choix du *quatrième entre-nœud*, dans les observations qui seront décrites ultérieurement, se justifie donc puisque, à ce niveau, les éléments de la solénostèle amphiphloïque sont complètement différenciés.

7° Influence du chlorure de sodium sur le développement du sporophyte.

Nous avons vu que les concentrations des ions présents dans le milieu témoin sont modifiées en faisant appel, pour respecter l'équilibre ionique, aux ions Na^+ et Cl^- comme ions accompagnateurs. Il fallait donc vérifier si ces éléments excédentaires n'influent pas sur les différents caractères du sporophyte. L'étude de leur action se ramène à celle du chlorure de sodium. A cette fin, deux expériences ont été effectuées. Pour l'une, les concentrations en NaCl s'échelonnaient entre 1 et 120 mM ; pour l'autre, entre 2,5 et 94,5 mM.

1° Aspect morphologique des cultures. —

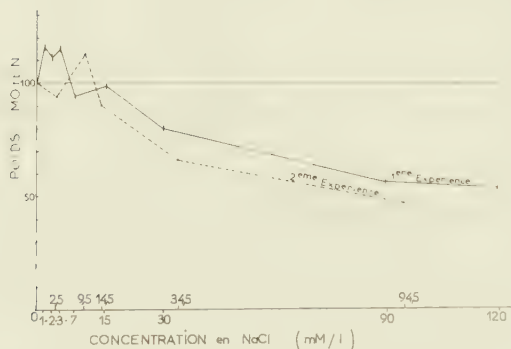


FIG. 11. — Influence du chlorure de sodium sur l'accroissement pondéral des sporophytes de *M. d.*, à la fin du 4^e passage.

En ordonnée, la valeur du poids moyen est exprimée en pour-cent de la valeur témoin égale à 379 mg (première expérience) et à 432 mg (deuxième expérience).

Les diverses concentrations de chlorure de sodium est consigné sur les graphiques de la figure 11. L'accroissement pondéral moyen est calculé sur douze mesures. Les résultats concordants des deux expériences montrent que :

2° Données quantitatives.

a. Accroissement pondéral.

— Le poids final des sporophytes de quatrième passage cultivés en présence des di-

* Que les feuilles successivement insérées sur le rhizome ne provoquent pas de changements notables dans la structure stélique observée au niveau des entre-nœuds (en particulier, ne modifie pas sensiblement le nombre des trachéides) vérifie le point de vue de BONNET [37] « sur l'autonomie morphologique de l'axe et constitue un argument défavorable à la théorie de la phyllorhize ».

Nous verrons cependant ultérieurement quel lien peut être établi entre le degré de développement de la moelle et celui des feuilles. Ces problèmes ont longuement été discutés par WARDLAW dans *Phylogeny and morphogenesis* [215].

— les sporophytes de *M. d.* ne sont pas modifiés par l'addition de NaCl dans leurs milieux nutritifs jusqu'à la concentration de 15 mM. Au-delà, une nette inhibition de la croissance est constatée. Elle est statistiquement significative pour la dose de 30 mM;

— les cultures d'automne (deuxième expérience) sont plus sensibles à un excès de NaCl que les cultures de printemps (première expérience).

b. Autres caractères quantitatifs. — L'analyse numérique des autres variables étudiées est résumée par les graphiques de la figure 12. Elle confirme en les précisant les résultats précédents. La détermination des limites de sécurité nous permet d'affirmer que :

— le nombre des feuilles et des racines est réduit au-delà de 15 mM, cette réduction n'excédant pas, aux plus fortes concentrations, respectivement 30 et 40 p. 100. Il est intéressant de noter que, à partir de 30 mM, la quantité de chlorure de sodium peut être quadruplée sans qu'il en résulte une diminution plus forte du pouvoir organogène de l'apex principal;

— l'élongation moyenne du rhizome est moins inhibée que l'élongation pétioleaire et n'est sensible qu'à des doses dépassant 30 mM;

— le système racinaire est, aux faibles concentrations (de 1 à 3 mM), très stimulé : il faut employer 90 ou 120 mM pour que l'élongation des racines soit fortement réduite;

— le nombre des feuilles quadrifides épanouies (tableau VI) est sous la dépendance de la concentration du milieu nutritif en chlorure de sodium : au-delà de 15 mM, ce nombre est réduit (30 mM) ou nul (90 ou 120 mM). Aux doses très toxiques, le chlorure de sodium empêche donc la maturation et l'épanouissement normal des feuilles.

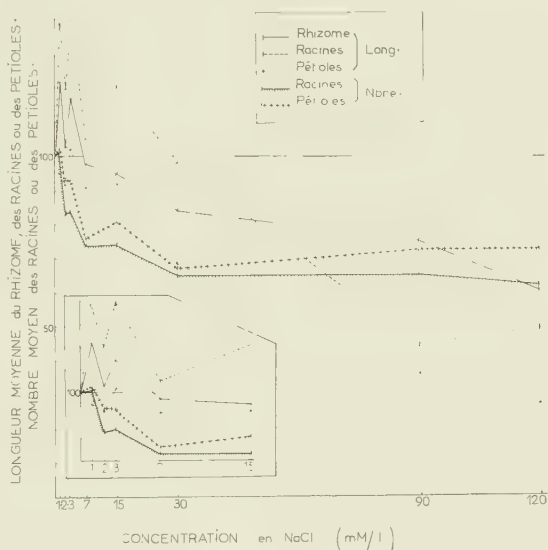


FIG. 12. — Variations, en fonction de la concentration en NaCl, des divers caractères quantitatifs des sporophytes de 4^e passage.

En ordonnée, les valeurs de ces caractères sont exprimées en pour-cent des valeurs témoins. Ces valeurs sont : longueur moyenne du rhizome, 21,4 mm ; longueur moyenne des racines par culture, 833 mm ; longueur moyenne des pétioles par culture, 561 mm ; nombre moyen des racines, 21,9 ; nombre moyen des pétioles, 8,3.

3^o Structure anatomique du rhizome. — Étudiée au niveau des six premiers entre-nœuds visibles comptés à partir de l'apex, la structure

TABLEAU VI. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CHLORURE DE SODIUM SUR LE NOMBRE DES FEUILLES ÉPANOUIES, EXPRIMÉ EN POUR-CENT DE LA VALEUR TÉMOIN.

CONCENTRATIONS EN NaCl (EN MM).							
1	2	3	7	15	30	90	120
95	120	95	97	90	60	0	0

anatomique du rhizome ne présente pas de modifications par rapport à celle des témoins. En particulier, la présence de chlorure de sodium dans le milieu de culture n'affecte pas le moment de la différenciation des trachéides qui n'est ni plus ni moins rapide.

Au niveau du quatrième entre-nœud, les mesures du diamètre du rhizome et de sa stèle (1) (effectuées sur une moyenne de douze coupes prélevées

TABLEAU VII. — DIAMÈTRES DU RHIZOME ET DE SA STÈLE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN CHLORURE DE SODIUM DU MILIEU NUTRITIF.

DIAMÈTRES exprimés en pour-cent des valeurs témoins.	CONCENTRATIONS EN NaCl (EN MM).							
	1	2	3	7	15	30	90	120
Rhizome.....	96	90	94	94	94	96	90	92
La stèle	88	84	88	85	84	81	76	82

sur les douze sporophytes cultivés) montrent que le chlorure de sodium n'affecte pas la taille du rhizome, même aux fortes concentrations (tableau VII). La stèle seule présente un diamètre un peu réduit. Un examen plus détaillé (fig. 10, *f*) montre qu'à la dose la plus élevée, le sel étudié ne modifie pas la configuration stélisque.

EN RÉSUMÉ, les ions Na^+ et Cl^- que l'on ajoute obligatoirement aux milieux dont on désire modifier la composition saline n'influent pas sur le poids final du sporophyte de quarante-cinq jours, considéré globalement, tant qu'ils ne sont pas utilisés à des doses supérieures à 15 ml. Les autres caractères qualitatifs ou quantitatifs du *Marsilea* sont plus ou moins sensibles à l'action des deux ions, comme le montre le tableau VIII.

(1) Le rhizome et sa stèle n'étant pas parfaitement circulaires mais elliptiques, c'est le grand diamètre de l'ellipse qui a toujours été mesuré.

TABLEAU VIII. — INFLUENCE DU CHLORURE DE SODIUM SUR LES DIVERS CARACTÈRES DU SPOROPHYTE DU *Marsilea*.

Les zones hachurées sont celles qui correspondent aux modifications provoquées par le chlorure de sodium (valeurs statistiquement différentes de celles fournies par les témoins).

CARACTÈRES ÉTUDIÉS.	CONCENTRATIONS EN MM.							
	1	2	3	7	15	30	90	120
Aspect morphologique								
Accroissement pondéral								
Nombre des feuilles								
Nombre des racines								
Longueur du rhizome								
Longueur des pétioles.....								
Longueur des racines.....								
Nombre des feuilles épanouies .								
Structure anatomique								

Les effets provoqués par les milieux nutritifs étudiés ultérieurement devront donc toujours être interprétés à la lumière de ceux que produisent l'un ou l'autre des deux ions accompagnateurs toujours présents. Seules, les modifications anatomiques ne pourront leur être imputées.

CHAPITRE III

ACTION DES DIVERS MACRO-ÉLÉMENTS CONSIDÉRÉS ISOLÉMENT

Dans ce chapitre est étudiée l'action de chacun des macro-éléments présents dans le milieu de référence. Les modifications qu'ils provoquent, suivant la concentration à laquelle ils sont fournis, permettront de déterminer leur rôle sur le développement du sporophyte du *Marsilea* et de préciser les exigences nutritives de ce dernier.

Nous n'oublierons pas que l'interprétation des données expérimentales est souvent délicate puisque la variation de la concentration en un ion influence l'absorption des autres ions présents dans le milieu de culture.

Pour chaque ion considéré isolément, on envisagera tout d'abord les effets que produit son absence du milieu et ensuite l'action d'une gamme de concentrations relativement étendue allant jusqu'à l'excès.

L'étude portera tout d'abord sur les cations Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ , puis sur les anions NO_3^- , SO_4^{--} , PO_4H_2^- .

1° *Les ions calcium.*

A. — EFFETS DE LA CARENCE CALCIQUE.

Le remplacement du sel de calcium par le sel équivalent de sodium entraîne l'introduction dans le milieu ainsi composé de 4,2 ml/l Na^+ . Les modifications provoquées par la carence calcique décrites ci-dessous ne pourront pas être attribuées à l'ion accompagnateur (cf. p. 209).

1° *Aspect morphologique.* — L'aspect morphologique des sporophytes au cours de quatre passages successifs est relativement variable : on peut définir *grosso modo* quatre types de culture.

TYPE I. — Il groupe les sporophytes les moins affectés par l'absence du cation (fig. 13 a);

- le mode de développement de l'explantat est normal;

- le rhizome dominant néo-formé est plus allongé que celui des témoins : les nœuds plus nombreux sont aussi plus espacés;

- les racines sont brunes et cassantes. Elles sont plus courtes, surtout au niveau des trois ou quatre nœuds proches de l'apex.

— les feuilles, plus faiblement pétiolées, portent quatre folioles réduites, appliquées les unes contre les autres et tachées de nécroses marginales. Les cultures portant des feuilles épanouies dans leur région moyenne sont extrêmement rares. Près de l'apex, on peut compter deux, trois ou quatre feuilles petites, enroulées en crosse, parfois bifides (fig. 13 *a*, remarquer *Fb*) alors que, dans les conditions normales, on n'en observe jamais plus d'une (cf. fig. 4) ;

— les bourgeons latéraux, toujours inhibés chez les témoins, entrent en

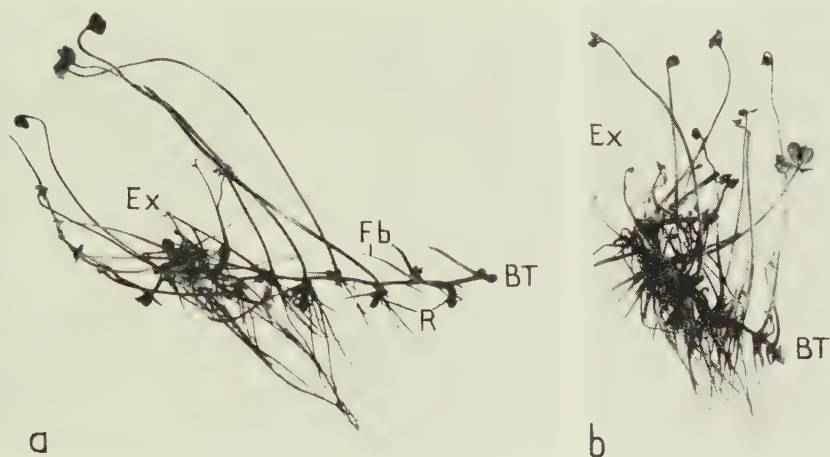


FIG. 13. — Aspects morphologiques des sporophytes de *M. d.* carencés en calcium ($\times 0,8$).

a : type 1. — *b* : type 2. La culture est très touffue ; les bourgeons latéraux sont presque tous entrés en activité.

Ex, région de l'explantat ; *BT*, bourgeon terminal ; *R*, ramification née de l'activité d'un bourgeon latéral ; *Fb*, feuille bifide.

activité ; ils donnent naissance à des rhizomes plus ou moins longs (R_1 , fig. 14 *a*) aux nœuds desquels s'observent des feuilles et des racines rudimentaires. Ces rameaux secondaires portent eux-mêmes des bourgeons en voie de développement (R_2 , fig. 14 *a*) : la ramification du rhizome principal est donc de premier et de second ordre ;

— le brunissement des tissus de l'axe principal affecte tout particulièrement sa région basale et médiane, la région apicale étant le plus longtemps exemptée par la nécrose. Cependant, lorsqu'il est très important, il n'épargne pas, au quarante-cinquième jour, l'apex des rhizomes principaux ou latéraux.

TYPE II. — Il est représenté par des cultures plus petites (fig. 13 *b*).

— Les modalités de croissance des explantatsensemencés sont toujours normales.

— Le rhizome dominant formé en quarante-cinq jours porte des nœuds assez rapprochés, en nombre égal à celui des témoins.

— Le développement des racines est inhibé : cassantes, noires, elles sont courtes.

— Les quatre folioles, observées à l'extrémité supérieure des pétioles peu étirés, ne sont jamais déployées dans un même plan horizontal ; elles diffèrent cependant des feuilles palmées décrites chez les témoins par leur plus grande surface.

L'ensemble du sporophyte présente de nombreuses plages brunes

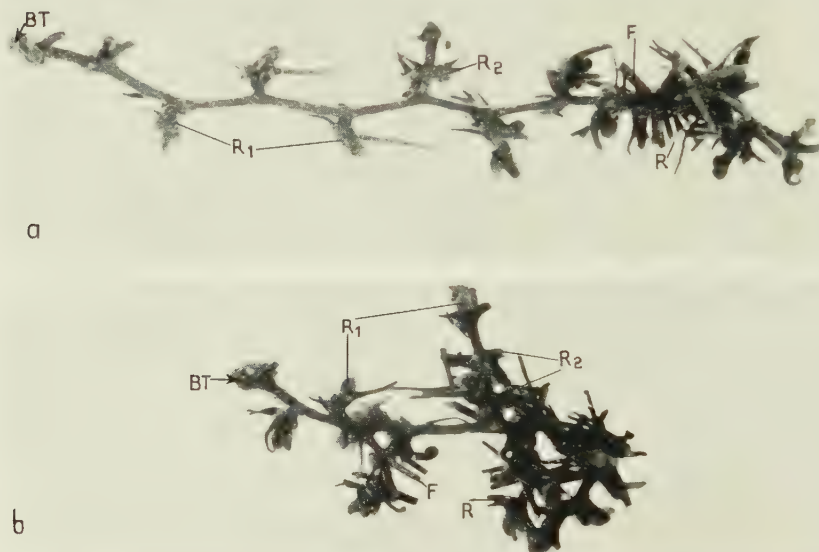


FIG. 14. — Détails du rhizome de sporophytes de *M. d.* carencés en calcium ($\times 2$
 a : rhizome de la culture du type 1 figurée en 13 A. — b : rhizome de la culture de type 2 figurée en 13 b.

Les feuilles *F* et les racines *R* du rhizome principal ont été sectionnées

*R*₁, ramification de premier ordre ; *R*₂, ramification de second ordre ; *BT*, bourgeon terminal.

qui n'épargnent pas l'apex principal, bien qu'elles l'affectent en dernier (*migration acropète de la nécrose*).

— Les ébauches de rhizomes secondaires *R*₁ (fig. 14 *b*) issues du fonctionnement des méristèmes extra-axillaires sont plus longues que celles décrites précédemment. Ces ramifications de premier ordre sont d'autant plus développées qu'elles sont plus éloignées de l'apex principal. Les feuilles bifides et les racines qu'elles portent sont plus nombreuses que sur les sporophytes de type 1, mais toujours aussi rudimentaires. Leurs propres bourgeons latéraux sont également en voie de croissance et sur les rhizomes *R*₂ se forment des feuilles grêles, toutes de type juvénile, difficilement observables à l'œil nu (fig. 14 *b*). De telles particularités morphologiques donnent à la plante l'aspect touffu propre aux sporophytes ramifiés.

TYPE III. — Sont groupées dans cette catégorie des cultures minuscules et très nécrosées (fig. 15 *a*).

— Les deux bourgeons de l'explantat (qu'il soit d'origine basale, médiane ou *apicale*) se développent avec à peu près la même amplitude, ce qui constitue une anomalie non encore observée chez les deux types qui viennent d'être décrits.

— Les nœuds des deux rhizomes néo-formés sont si rapprochés que les entre-nœuds ne sont plus guère visibles.

— Le développement des racines est très fortement inhibé : elles se présentent sous forme de petites pointes noires et fragiles.

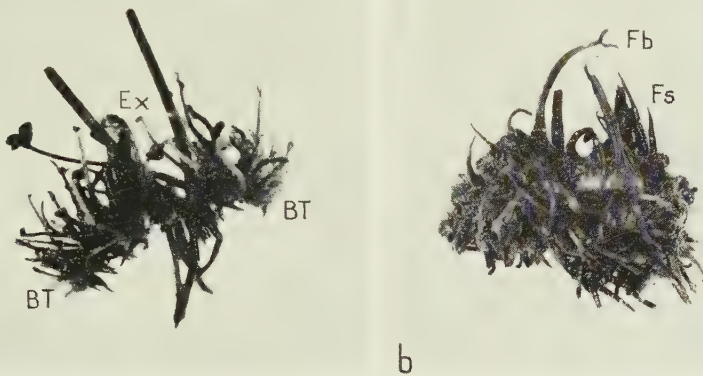


FIG. 15. — Aspects morphologiques des sporophytes de *M. d.* carencés en calcium ($\times 2$).

a : type 3. Les deux bourgeons de l'explantat se sont développés à peu près également. — *b* : type 4. De la « boule » nécrotique formée par l'ensemble des organes sporophytiques émergent quelques feuilles bifides et spatulées.

Ex, explantat ; *BT*, bourgeon terminal ; *Fb*, feuille bifide ; *Fs*, feuille spatulée.

— Les feuilles chlorotiques ou brunâtres, très cassantes, sont toutes spatulées ou bifides. *La carence calcique conduit à la formation de feuilles juvéniles*, ce qui indique, en d'autres termes, qu'elle perturbe de façon extrêmement importante le développement hétéroblastique normal de la plante. Mais, alors que chez la jeune plantule les premières feuilles formées, quoique plus ou moins simples, présentent tous les signes de « santé physiologique » (turgescence, pigmentation...), dans le cas présent, elles comportent tous les symptômes d'une croissance défectueuse (petitesse, nécroses, fragilité...).

— Les ramifications de premier ordre atteignent, proportionnellement à la taille générale de la culture, une longueur presque aussi grande que celle de son propre rhizome principal : c'est dans ce sens que nous parlerons ultérieurement de cultures très ramifiées.

— Les méristèmes caulinaires, qu'ils soient principaux ou latéraux, restent le plus longtemps vivants quoique chlorotiques. L'aspect extrêmement dense des sporophytes est renforcé par la présence de rameaux d'ordre 2, porteurs d'organes si rudimentaires qu'il faut les observer à la loupe pour les déceler.

TYPE IV. — Dans des cas extrêmement rares, nous avons obtenu des cultures encore plus touffues, qui présentaient des modifications encore plus accentuées que celles décrites ci-dessus (fig. 15 *b*). Le type IV groupe des sporophytes minuscules ayant un aspect « en boule » dû au tassement de leurs divers organes, rhizome, feuilles et racines. Ce type, non repiquable parce qu'entièrement nécrotique, représente le degré le plus poussé des anomalies morphologiques provoquées par la carence calcique : la quasi-totalité des cultures sont mortes avant de parvenir à ce stade.

La majorité des sporophytes de types III et IV occupent dans le tube de culture une position anormale : ils ne flottent plus dans le milieu nutritif, mais tombent au fond de celui-ci.

Quelques remarques sur ces divers types morphologiques s'imposent :

1^o Les importantes modifications morphologiques provoquées par l'absence de calcium sont obtenues quelle que soit la période de l'année où s'opère l'observation et quel que soit le nombre de repiquages qu'aient subi les cultures souches destinées à l'essai. L'ampleur des aberrations structurales provoquées par la carence montre que le calcium est absolument nécessaire au développement normal de *M. d.* Les symptômes que provoque son absence, en particulier l'apparition de nécroses qui n'épargnent pas les méristèmes, qu'ils soient foliaires, radiculaires ou caulinaires, ne diffèrent pas considérablement de ceux décrits chez d'autres végétaux [17, 22, 65, 66, 81, 131, 136, 181, 204]. Nos observations cependant s'opposent à celles d'autres chercheurs quant au sens de la marche de la nécrose : chez la tomate, par exemple, KALRA [111] remarque qu'elle affecte d'abord l'apex et se propage ensuite vers le bas de la tige. Chez le *Marsilea*, le mouvement est exactement inverse, point important que nous décrirons et discuterons plus longuement dans un prochain chapitre, mais qui explique dès maintenant que les sporophytes nécrosés puissent encore subir des repiquages successifs, leurs points végétatifs principaux (ou latéraux proches de l'apex) étant les derniers atteints.

2^o Notre attention a été tout particulièrement retenue par l'incapacité du système foliaire d'atteindre son plus haut degré de différenciation : lorsque la carence est le plus fortement ressentie, le développement hétéroblastique est perturbé, voire bloqué : l'absence du cation conduit au développement de feuilles juvéniles, feuilles dont la présence est anormale puisqu'elles se forment sur des plants « physiologiquement adultes », c'est-à-dire des plants qui ne portent normalement que des feuilles quadricolles (cf. p. 196).

3^o Autre modification extrêmement curieuse : le développement des bourgeons latéraux portés par le rhizome. Toujours inhibés dans leur croissance lorsque les conditions nutritives sont favorables, ils donnent naissance, dans le cas de la carence calcique, à des ramifications plus ou moins longues. Il faut noter dès à présent que cette anomalie, qui indique une levée de la dominance apicale, s'observe, au moins à son début, avant

que l'apex principal ne soit atteint par la nécrose. Dans la nombreuse bibliographie concernant ce sujet, le buissonnement des tiges principales a toujours été expliqué par la mort prématurée du bourgeon terminal qui n'est plus en mesure d'inhiber les bourgeons placés sous lui. Les résultats d'expériences entreprises pour élucider les facteurs responsables de la ramification du *Marsilea* nous permettront d'en donner une autre explication.

2° Fréquence des différents types, au cours de quatre passages successifs sur milieu dépourvu de calcium. — Au cours d'un premier essai a été déterminée la fréquence des différents types morphologiques observés au cours de quatre passages successifs. Dès le deuxième repiquage, les explantats sont prélevés *au hasard* parmi les cultures qui ont déjà subi un premier passage sur milieu sans calcium : il suffit que les points végétatifs apicaux ou latéraux soient vivants pour être repiqués, quel que soit le type de la culture fragmentée.

Dans un deuxième essai était précisé le type de la culture utilisée au cours des ensemencements successifs.

Les résultats numériques ont été obtenus sur un grand nombre de sporophytes (de 100 à 150).

PREMIER ESSAI : LE TYPE DE LA CULTURE FRAGMENTÉE AU COURS DES REPIQUAGES SUCCESSIFS N'EST PAS PRÉCISÉ. — De l'examen des graphiques de la figure 16, il ressort que les sporophytes de type 1 sont les plus fréquents à la fin d'un premier passage et que, le nombre des repiquages augmentant, c'est-à-dire la carence calcique devenant plus aiguë, c'est le type 3 qui prédomine. Le type 4, rarement observé puisque la quasi-totalité des cultures meurt avant de parvenir à ce stade, n'est présent qu'à la fin du quatrième passage.

Alors qu'au cours des trois premiers passages la mortalité, pour cet essai, est assez faible (8, 10 et 19 p. 100), elle est importante à la fin du quatrième (87 p. 100). Les sporophytes survivants ne supportent pas le choc qu'occasionne un cinquième repiquage.

DEUXIÈME ESSAI : INFLUENCE DU TYPE REPIQUÉ AU COURS DES PASSAGES SUCCESSIFS. — Toutes les cultures obtenues à la fin du premier passage ont été repiquées sans exception.

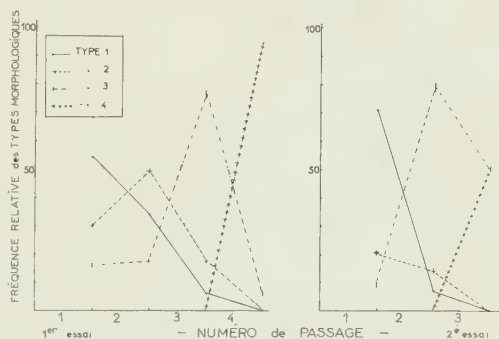


FIG. 16. — Fréquence des divers types morphologiques présentés par les sporophytes de *M. d.* cultivés pendant 4 passages successifs sur milieu sans calcium.

Les fréquences sont exprimées en pour-cent des cultures vivantes.

Les résultats sont consignés dans le tableau IX et la figure 16.

A la fin du premier passage, la majorité des sporophytes est du type 1. La mortalité est nulle. Ces résultats, dans leur ensemble, sont peu différents de ceux obtenus au cours du premier essai.

A la fin du deuxième passage, on remarquera que :

1° La mortalité des cultures est d'autant plus importante que l'explantat dont elles sont issues appartient à un type plus touché par la carence au premier passage.

2° Les cultures de type 1 (7,2 p. 100 pour l'ensemble des sporophytes de l'expérience, cf. fig. 16) sont très rares : elles sont toutes issues des sporophytes de ce type.

3° La majorité des cultures est du type 3 (cf. fig. 16). Ce type est d'autant plus fréquent que le plant dont il dérive est « plus ramifié » dès le premier passage (tableau IX). Ainsi la fragmentation du type 1 conduit à la formation de 54 p. 100 de cultures du type 3, alors que le type 2 en donne 86 p. 100 et que les explantats prélevés sur le type 3 ne donnent plus que des cultures de ce type.

On remarquera que ces résultats diffèrent de ceux obtenus au cours du premier essai : le type 2, alors prédominant à la fin du deuxième passage, est, dans le cas présent, fort épisodique.

A la fin du troisième passage, deux sporophytes seulement sur 124 ont survécu : l'un est du type 3, l'autre du type 4. Ils dérivent d'explantats prélevés sur des cultures appartenant aux types les moins aberrants.

La mortalité, beaucoup plus importante au cours de cette expérience, peut s'expliquer par le fait que tous les explantats ont étéensemencés, quel que soit leur état physiologique : chez beaucoup d'entre eux, les bourgeons apicaux et latéraux avaient été atteints par la nécrose au cours du passage précédant leur repiquage.

Il est légitime de conclure de l'examen de ces deux essais que les divers types morphologiques observés correspondent à des degrés de plus en plus accentués de carence et sont les manifestations extérieures de troubles de plus en plus profonds.

3° Accroissement pondéral. — Les résultats numériques obtenus au cours de différents essais sont consignés dans le tableau X. Ils montrent que les cultures, à la fin du premier passage, se développent plus, autant ou moins que les témoins et que la diminution de croissance n'est importante qu'au cours des passages suivants.

Il paraîtra curieux que, dans certains cas (R²¹ et R²⁸), l'accroissement pondéral des sporophytes de premier passage (en très grande majorité de type 1) soit très nettement exalté. Un tel fait peut, de prime abord, paraître paradoxal. Nous verrons plus loin que le milieu témoin sur lequel sont cultivées les souches utilisées au cours des expériences ici décrites est beaucoup trop riche en calcium : aussi, les explantats prélevés sur 3e

TABLEAU X. — INFLUENCE DE LA CARENCE CALCIQUE SUR L'AGGROISSEMENT PONDÉRAL DES SPOROPHYTES DU *Marsilea* AU COURS DE QUATRE PASSAGES SUCCESSIFS. (LES DONNÉES NUMÉRIQUES SONT EXPRIMÉES EN POUR-CENT DES VALEURS TÉMOINS.)

1 ^{er} PASSAGE.	2 ^e PASSAGE.	3 ^e PASSAGE.	4 ^e PASSAGE.
R ₆ : 93 $\frac{0}{100}$	R ₇ : 55 $\frac{0}{100}$	R ₈ : 30 $\frac{0}{100}$	R ₉ : 25 $\frac{0}{100}$
R ₁₆ : 75 $\frac{0}{100}$	R ₁₇ : 42 $\frac{0}{100}$	R ₁₈ : 30 $\frac{0}{100}$	—
R ₂₁ : 122 $\frac{0}{100}$	R ₂₂ : 61 $\frac{0}{100}$	R ₂₃ : 22 $\frac{0}{100}$	—
R ₂₄ : 78 $\frac{0}{100}$			
R ₂₅ : 80 $\frac{0}{100}$			
R ₂₇ : 103 $\frac{0}{100}$			
R ₂₈ : 136 $\frac{0}{100}$			

telles souches peuvent-ils s'accommoder mieux, dans certains cas (souches moins fragiles, conditions saisonnières plus favorables, produits moins purs), des nouvelles conditions qui leur sont offertes, pourvu que celles-ci ne soient pas durables.

4^o Structure anatomique du rhizome. — I. RHIZOME DES SPOROPHYTES DE TYPE 1. — La structure anatomique a été étudiée sur des cultures de premier passage.

1^o L'examen de coupes effectuées *au niveau des six premiers entrenœuds* visibles à l'œil nu et comptés à partir de l'apex montre que les trachéides scalariformes sont toutes lignifiées à un niveau plus proche de l'apex que chez les témoins : dès la fin du deuxième entrenœud, l'arc xylémien est complètement formé ; on peut donc dire que la *différenciation du système vasculaire est activée en l'absence de calcium*.

2^o *Au niveau du quatrième entrenœud* (fig. 17 et 18 a) et dans les entrenœuds suivants :

— le diamètre de l'axe est peu modifié. L'importance relative de la stèle est toujours égale au tiers environ du rhizome considéré dans son ensemble ;

— la structure est normale. On remarquera cependant que les parois cellulaires des éléments du parenchyme cortical sont épaissies par un dépôt de cellulose ou de lignine.

II. RHIZOME DES SPOROPHYTES DE TYPE 2. — Que les coupes soient prélevées sur des cultures de premier ou de deuxième passage, les modifications qu'elles présentent sont semblables.

1^o L'observation des coupes pratiquées dans *les six premiers entrenœuds* montre que la différenciation des trachéides est, comme précédemment, plus précoce que chez les témoins : elles sont toutes lignifiées à la fin du deuxième entrenœud.

2^o *Au niveau du quatrième entrenœud* (fig. 17, b et c) :

— le diamètre du rhizome et de sa stèle (dont l'importance relative

reste normale) est sensiblement réduit, réduction provoquée à la fois par une diminution de la taille et du nombre des cellules ;

— l'aérenchyme comporte des lacunes de faible surface, explication vraisemblable de la diminution de la flottabilité des cultures :

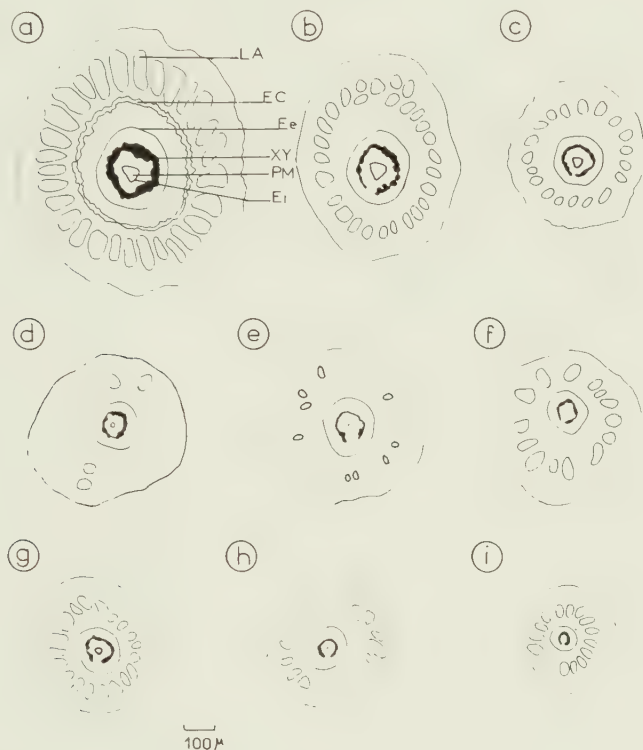


FIG. 17. — Schémas de coupes pratiquées dans les rhizomes principaux et latéraux de sporophytes de *M. d.* carencés en calcium.

a : type 1 de 1^{er} passage, 4^e entre-nœud du rhizome principal. — *b* : type 2 de 1^{er} passage, 4^e entre-nœud du rhizome principal. — *c* : type 2 de 2^e passage, 4^e entre-nœud du rhizome principal. — *d* : type 3 de 3^e passage, 4^e entre-nœud du rhizome principal. — *e* : type 3 de 3^e passage, région basale de la ramification. — *f* : type 3 de 3^e passage, région médiane de la ramification. — *g* et *h* : type 4 de 4^e passage, rhizomes principaux. — *i* : type 4 de 4^e passage, ramification.

On notera la réduction progressive de la taille de la stèle et le passage de la solénostèle amphiphloïque à la protostèle médullée.

LA, lacune aërifère de l'aérenchyme ; PM, parenchyme médullaire ; EC, épauissements celluliques ; Ee et Ei, endodermes externe et interne ; XY, xylème.

— quelques cellules du parenchyme cortical comportent une paroi cellulosique épaissie ;

— le xylème est constitué par des trachéides de petit calibre, à paroi lignifiée amincie.

— les autres tissus, phloèmes, endodermes, ne sont guère modifiés.

III. RHIZOME DES SPOROPHYTES DE TYPE 3. — Les changements opérés dans la structure anatomique sont du même ordre, que les coupes soient

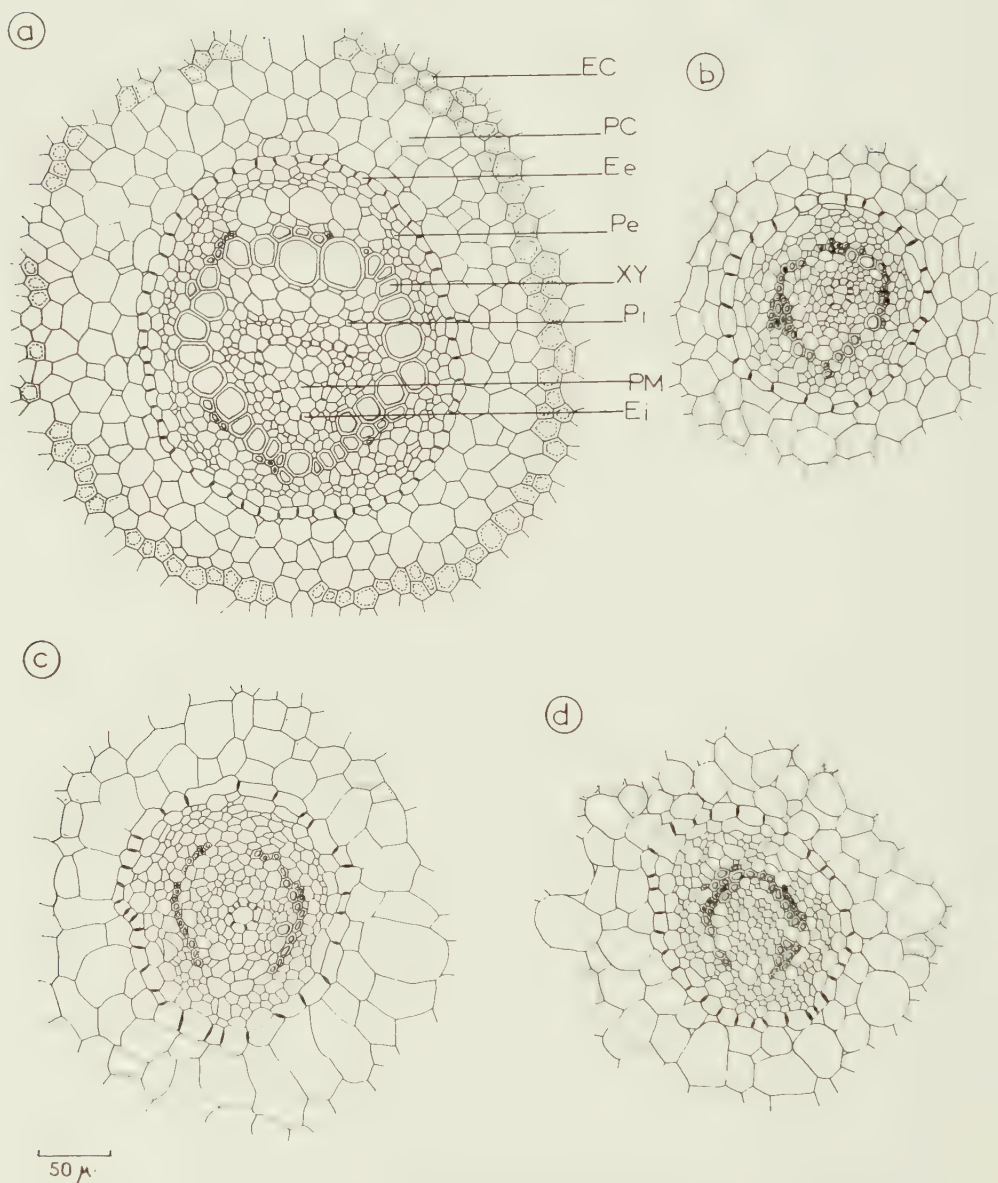


FIG. 18. — Structure stélisque des rhizomes de *M. d.* carencés en calcium.

a : type 1 (cf. fig. 17 *a*). — *b, c, d* : type 3 (cf. fig. 17 *d, e, f*)

Remarquer la réduction (*b* et *c*) et la disparition de la moelle (*d*). Quelques cellules du parenchyme cortical et de l'endoderme externe sont hypertrophiées.

Pe et *Pi*, phloèmes externe et interne. Pour les autres légendes, voir figure 17.

prélevées sur des sporophytes de deuxième ou de troisième passage : la carence calcique agit alors plus sur la taille du rhizome que sur sa configuration.

A l'étude des modifications observables au niveau du rhizome principal a été adjointe celle des ramifications latérales.

a. *Rhizome principal*. — 1° Comme dans les deux cas déjà envisagés, la différenciation des trachéides est plus précoce que chez les témoins, d'une part, et que chez les sporophytes de types 1 et 2, d'autre part : dès le début du deuxième entre-nœud, l'arc xylémien est complètement formé. On remarquera que, les nœuds du rhizome étant très rapprochés chez le type 3 comme nous l'avons noté page 213, les trachéides sont, par conséquent, toutes différenciées à une distance très proche de l'apex, presque immédiatement sous lui.

2° Au niveau du quatrième entre-nœud :

— le diamètre du rhizome est considérablement réduit (fig. 17 *d* et 18 *b*) ;

— l'aérenchyme ne présente plus que des lacunes si petites qu'elles ne sont plus aisément discernables ;

— de nombreuses cellules parenchymateuses de l'écorce ont une paroi cellulosique épaissie ;

— la stèle, qui équivaut toujours au tiers environ du rhizome, comprend des éléments conducteurs, xylémiens ou phloémiens, en nombre nettement réduit ;

— les trachéides, petites, à parois minces, ont une forme elliptique alors qu'elles sont toujours polygonales dans les conditions normales ;

— en plus de ces modifications, déjà observées chez le type 2 quoi- qu'elles y soient moins prononcées, on note l'hypertrophie des cellules de l'endoderme externe accompagnée d'une diminution de leur nombre : représentée par une soixantaine de cellules chez les témoins, cette assise ne comporte plus qu'une quarantaine d'éléments chez le type 3 de deuxième passage et à peine une trentaine chez celui de troisième passage ;

— les cellules médullaires suivent le même processus : leur nombre passe respectivement de vingt-quatre (témoins) à quinze et deux (cultures carencées).

b. *Rhizomes latéraux*. — Les coupes ont été pratiquées dans les ramifications qui limitent le quatrième entre-nœud. La structure du rhizome latéral de premier ordre est différente suivant le niveau où elle est observée.

— *A la naissance de la ramification*, c'est-à-dire dans sa région la plus âgée, elle offre une structure identique à celle de l'axe principal (fig. 17, *e* et *f*, et 18, *c* et *d*) ; les modifications y sont seulement plus accentuées : hypertrophie des cellules de l'endoderme externe, réduction du nombre et du calibre des trachéides et des cellules médullaires, etc.

— *Dans la région médiane du rameau latéral*, au niveau de son troisième ou quatrième entre-nœud, la structure est très différente : aux changements de structure déjà décrits, il faut ajouter la disparition de la moelle, de l'endoderme et du phloème internes, formations remplacées par un parenchyme banal.

Autrement dit, au niveau des ramifications qui portent des feuilles très rudimentaires de type juvénile, la structure stélisque est moins complexe : de solénostèle amphiphloïque, elle devient protostèle médullée (1).

IV. RHIZOME DES SPOROPHYTES DE TYPE 4. — Sur les quelques cultures de type 4 qu'il a été possible d'examiner, on retrouve les mêmes modifications : en particulier, la réduction progressive de la moelle et sa complète disparition au niveau des ramifications (fig. 17, *g*, *h* et *i*).

EN RÉSUMÉ, les changements provoqués chez la plante par la carence en calcium se répercutent non seulement sur son aspect morphologique, mais aussi sur l'anatomie de son rhizome. Ainsi, conjointement à une réduction de sa taille, l'axe comporte moins d'éléments conducteurs. La diminution progressive du nombre des cellules médullaires, puis leur disparition totale, aboutissent à la présence d'une stèle dont la structure est l'une des moins complexes que l'on puisse observer chez le *Marsilea*. Cette simplification de la structure stélisque va de pair avec un développement rudimentaire des feuilles portées par le rhizome principal ou par les ramifications — feuilles aux formes juvéniles — et avec une croissance générale très diminuée.

5° Dosage du calcium présent dans les tissus des divers sporophytes.

— L'étude de la fréquence des types observés au cours de passages consécutifs sur milieu dépourvu de cet ion invite à penser que l'accentuation des perturbations est due à ce que les sporophytes en sont de plus en plus appauvris.

Effectués sur les trois types de cultures les plus fréquemment observés, les dosages ont donné les résultats suivants (tableau XI) : la chute de la teneur en calcium des tissus les moins modifiés est brutale, que l'on considère le poids frais ou le poids sec. Ensuite, la carence étant plus durable, le taux de calcium diminue lentement, quoique de manière continue. Sans doute, à des doses aussi faibles, le calcium agit-il comme *facteur limitant* : comme dans tous les cas semblables, les tissus de la plante fortement appauvris en un élément nutritif deviennent alors, en quelque sorte, « sensibilisés » vis-à-vis de lui. D'où cette apparente disproportion entre la cause et les effets, entre une faible variation de la teneur en calcium et une modification notable de la structure du sporophyte.

Il faut admettre, en outre, que les explantats subissent différemment, dans ces conditions, les chocs reçus au cours d'un premier passage lorsqu'ils sont ensemencés sur milieu incomplet. Une partie d'entre eux continueront à se développer plus ou moins normalement (type 1); d'autres, à des degrés divers, souffriront plus et donneront les types 2 et 3. Relativement homogènes dans leur croissance lorsqu'ils sont prélevés sur des souches robustes et soumis à des traitements favorables, les explantats, placés

(1) WARDELOW [215] et ALLSOPP [7] ont appelé *medullated protostele* cette structure qui constitue le terme intermédiaire entre la protostèle et la solénostèle.

TABLEAU XI. — TENEUR EN CALCIUM DES SPOROPHYTES DU *Marsilea* CULTIVÉS PENDANT TROIS PASSAGES SUCCESSIFS SUR UN MILIEU DÉPOURVU DE CET ION.

TYPES DE SPOROPHYTES.	QUANTITÉS DE CALCIUM DOSÉ (exprimées en mg).			
	Par rapport à 100 g de poids frais.		Par rapport à 1 g de poids sec.	
<i>Témoins :</i>				
R ₁₉	213,7	100 %	18,96	100 %
R ₂₁	212,4	100 %	18,70	100 %
<i>Type 1. 1^{er} passage :</i>				
R ₁₉	18,0	8,4 %	1,12	5,9 %
R ₂₁	18,2	8,6 %	0,81	4,3 %
<i>Type 2. 2^e passage :</i>				
R ₂₂	14,5	6,8 %	0,60	3,2 %
<i>Type 3. 2^e passage :</i>				
R ₂₂	11,8	5,5 %	0,39	2,1 %
<i>Type 3. 3^e passage.</i>				
R ₂₁	10,1	4,7 %	0,38	2 %

dans des milieux inadéquats ou bien issus de cultures ayant déjà été lésées par de mauvaises conditions nutritives, présentent des développements plus hétérogènes. Phénomène courant, l'augmentation de la variabilité en cas de désordre nutritif a déjà été signalée (HELLER [93], SOS-SOUNTZOV [182]).

6° Teneur en eau des tissus carencés. — Les résultats numériques sont groupés dans le tableau XII. De son examen, il ressort que les témoins sont plus riches en eau que les cultures carencées en calcium, et que les tissus sont d'autant plus déshydratés que leur croissance a été plus inhibée.

La vie ralentie, traduite par la chute de poids, l'apparition de nécroses et l'impossibilité pour les organes de s'allonger normalement, est caractérisée par la déshydratation cellulaire. Comme nous le verrons plus loin, ces sporophytes chétifs accumulent plus d'amidon, de lipides et de tanins, produits qui augmentent leur poids sec. Alors que les témoins les utilisent au fur et à mesure de leur formation et accumulent donc peu de réserves, les cultures carencées ont un métabolisme glucidique et lipidique réduit ou bloqué, d'où une variation de leur teneur en eau par variation de leur poids sec.

TABLEAU XII. — TENEUR EN EAU DES TISSUS CARENCÉS EN CALCIUM PENDANT TROIS PASSAGES.

TYPES DE CULTURES.	POURCENTAGE D'EAU DES TISSUS.
<i>Témoins :</i>	
R ₁₉	88,6
R ₂₁	89,2
R ₂₅	88,5
R ₂₇	86,5
<i>Type 1. 1^{er} passage :</i>	
R ₁₉	77,7
R ₂₁	83,7
R ₂₇	83,5
<i>Type 2. 2^e passage :</i>	
R ₂₂	75,8
<i>Type 3. 2^e passage :</i>	
R ₂₂	72
<i>Type 3. 3^e passage :</i>	
R ₂₃	71,6

Nous retrouvons là un phénomène bien connu : la « vitalité » d'un végétal, son pouvoir de prolifération, se reflètent sur son métabolisme hydrique.

7^o Observations complémentaires. — Bien que débordant le cadre de ce paragraphe consacré à l'étude de la carence calcique, nous relaterons ici les résultats de deux expériences entreprises pour répondre à deux questions que nous nous sommes posées.

a. *Comment se comportent les sporophytes de type 1 lorsqu'on les transpose sur milieu témoin ?*

L'essai a été mené de la manière suivante : douze sporophytes de premier passage ont été transplantés *entiers* sur milieu complet. Six d'entre eux présentaient un aspect à peu près normal : nécroses foliaires ou radiculaires légères, présence de ramifications courtes, bourgeons chlorophylliens et turgescents. Six autres ont été choisis parce qu'ils montraient des lésions plus profondes : plus nécrotiques, ils étaient aussi plus ramifiés.

Observées au bout d'un mois après la transplantation, les six cultures les moins aberrantes se développent normalement : *le rhizome néoformé provient de l'activité de l'apex principal de la culture d'origine*, ce qui montre qu'à son niveau les lésions occasionnées par un premier passage sur milieu sans calcium ne sont pas importantes puisqu'il est capable de

fonctionner à nouveau normalement si la nutrition redevient favorable. Les bourgeons latéraux du nouveau rhizome ne montrent aucun signe de développement. Cependant, les ramifications formées avant la transplantation continuent, au moins au début de l'expérience, de s'allonger et de former des feuilles quadrifides palmées à la base desquelles les bourgeons sont normaux.

Les six cultures plus nécrosées ne montrent pas de reprise d'activité, que celle-ci provienne des méristèmes apicaux ou latéraux. Dans un seul cas, un bourgeon latéral proche de l'explantat s'est un peu développé et a donné trois feuilles, la première bifide, les deux suivantes enroulées en crosse et comportant quatre folioles. Il est bien évident que, chez ces cultures, *la nécrose avait atteint tous les points végétatifs et les avait irrévocablement endommagés.*

b. *Quelle est la quantité minimale de calcium permettant le développement normal du sporophyte ?*

Les explantats prélevés sur des cultures de type 1 sont repiqués sur des milieux auxquels ont été ajoutées de faibles quantités de calcium (sous forme de chlorure) s'échelonnant entre 0,01 et 0,125 mI/litre.

Observés quarante-cinq jours après le repiquage, les sporophytes sont tous normaux.

Poursuivi pendant un deuxième passage, l'essai a montré que les plus faibles concentrations (de 0,01 à 0,07 mI) permettent le développement habituel des cultures et sont suffisantes pour bloquer la croissance des bourgeons latéraux. Elles sont, par contre, trop faibles pour empêcher l'apparition de nécroses et la fanaison prématurée des folioles. Sur les plus fortes concentrations, on n'observe aucune différence d'aspect des témoins et des cultures primitivement de type 1. Elles sont seulement plus grêles. *Il suffit donc de fournir de très faibles doses de calcium à l'explantat de M. d. pour qu'il effectue sa croissance normale et surtout pour bloquer le développement des bourgeons latéraux portés par le rhizome.* Ses besoins sont extrêmement faibles; ils correspondent à des concentrations oligodynamiques.

B. - ACTION DES IONS CALCIUM.

Les concentrations étudiées s'échelonnent de 0,125 à 60 mI.

1^o Aspect morphologique. — Dès qu'on ajoute un peu de calcium au milieu nutritif, les différentes anomalies observées en cas de carence totale disparaissent: les cultures présentent un aspect voisin de celui des témoins.

a. *A la plus faible concentration (0,125 mI), les sporophytes, normaux, sont moins robustes que les témoins, comme nous l'avons dit ci-dessus.*

b. *Aux concentrations comprises entre 0,250 et 2 mI, inférieures donc à celles du milieu de référence, les cultures présentent le plus beau développement.*

— Leur rhizome est plus allongé que celui des contrôles, allongement dû à l'élongation des entre-nœuds, le nombre des nœuds qu'il porte étant peu modifié.

Les feuilles, toutes quadrifides, portent quatre folioles largement déployées.

Ces deux types d'organes sont intensément chlorophylliens.

— Les racines, longues et blanchâtres, sont pourvues de nombreux poils absorbants et ne montrent aucun signe de brunissement, même dans la région proche de l'explantat.

Apparues dès le premier passage, ces caractéristiques morphologiques s'observent ensuite pendant toute la durée de l'expérience.

c. Il faut ajouter de *fortes doses* (15 à 30 ml) pour provoquer des malformations des sporophytes, qui sont alors plus petits que les témoins.

— Le mode de développement de l'explantat est cependant normal.

— Le rhizome, peu allongé, porte des nœuds très rapprochés.

— Les feuilles, faiblement pétiolées et chlorotiques, sont palmées ou gardent leur forme « en crosse » typique d'un développement inachevé.

— Les racines, courtes, sont ondulées et cassantes.

d. Les désordres les plus importants sont provoqués par la *plus forte concentration* (60 ml).

Dès le premier passage, le développement du rhizome dominant, des feuilles et des racines est fortement inhibé (fig. 19 a).

Les feuilles, quadrifides, sont palmées ou en crosse.

Chlorose et nécrose sont importantes.

Les bourgeons latéraux sont anormalement gros. Certains ont donné naissance à des feuilles secondaires grêles.

Au cours de plus nombreux passages, ces anomalies ont tendance à s'accroître : de plus en plus grêles et nécrotiques, les sporophytes portent des feuilles à folioles

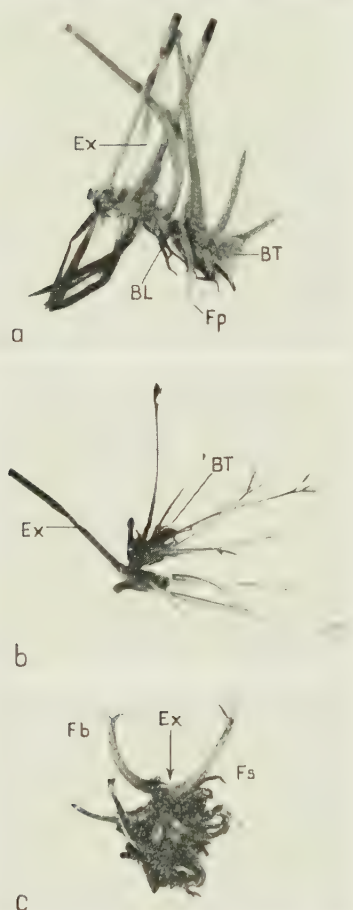


FIG. 19. — Aspects morphologiques de sporophytes de *M. d.* cultivés sur un milieu contenant 60 ml/l de calcium, pendant 4 passages consécutifs ($\times 2$).

a : à la fin du 1^{er} passage. La feuille *Fp* provient du développement du bourgeon latéral *BL*. — b : à la fin du 3^e passage. Les folioles sont effilées et pointues. — c : à la fin du 4^e passage. Noter l'aspect touffu de la culture.

De la masse nécrotique émergent des feuilles du type juvénile.

Ex, explantat ou emplacement de celui-ci. Il a été partiellement (b) ou complètement (c) supprimé pour que les figures soient plus claires ; *BT* et *BL*, bourgeons terminal et latéral ; *Fs* et *Fb*, feuilles spatulée et bifide.

petites, effilées et pointues. Le grossissement des bourgeons latéraux est plus intense. Les organes foliaires et radiculaires qu'ils initient sont si rudimentaires qu'ils sont peu visibles à l'œil nu (fig. 19 *b*).

Les deux bourgeons de l'explantat ont tendance à se développer de manière à peu près égale. La mortalité des cultures, nulle en début de traitement, est totale avant la fin du quatrième passage : avant de mourir, les explantats forment des masses nécrotiques « en boule » d'où pointent quelques feuilles trapues, palmées, puis bifides et spatulées (fig. 19 *c*).

Il est évident que ces anomalies sont provoquées (au moins en partie) par les ions calciques. A cette dose excessive, leur toxicité, traduite par les modifications morphologiques qui viennent d'être décrites, est beaucoup plus forte que celle due aux ions Cl^- introduits. Comme nous l'avons vu page 209, cette teneur en ions accompagnateurs ne conduit pas à de telles aberrations.

2° *Données quantitatives.* — a. *Accroissement pondéral.* — L'examen des courbes de la figure 20 montre que :

— sur le milieu contenant 0,125 mI, le poids final moyen des sporophytes de deuxième passage n'est pas différent de celui des témoins alors qu'il est plus faible (diminution statistiquement significative) à la fin du quatrième passage. Autrement dit, une faible teneur en calcium n'est que momentanément suffisante :

— aux concentrations comprises entre 0,250 et 1,5 mI, inférieures à celle du milieu de référence, la croissance est exaltée. L'optimum se situe à 0,5 mI (soit une teneur quatre fois plus faible) ;

— la toxicité des fortes concentrations (au-delà de 8 mI) est d'autant plus marquée qu'elle est plus durable. Elle n'est pas entièrement attribuable aux ions chlore qui, à des doses équivalentes, provoquent une diminution de croissance beaucoup moins importante.

Ces observations nous conduisent à insister sur la nécessité d'effectuer plusieurs passages sur un milieu dont on désire expérimenter les effets, surtout lorsqu'il s'agit de l'étude des doses extrêmes, insuffisantes ou excessives.

b. *Autres variables.* — L'étude des autres caractères quantitatifs a porté sur les sporophytes cultivés en présence de toutes les concentrations expérimentées, à l'exception toutefois de la plus forte : dans ce cas, en effet, il n'était guère possible de mesurer avec précision les organes développés au cours du quatrième passage, du fait de leur fragilité et de leur structure extrêmement dense.

Les graphiques de la figure 21 précisent en les complétant les observations précédentes :

— le nombre des organes formés (racines ou feuilles) varie moins que leur élongation. Seules les doses notablement anormales (insuffisantes ou excessives) diminuent le pouvoir organogène du point végétatif principal. L'optimum de concentration, déterminé précédemment sur la base du

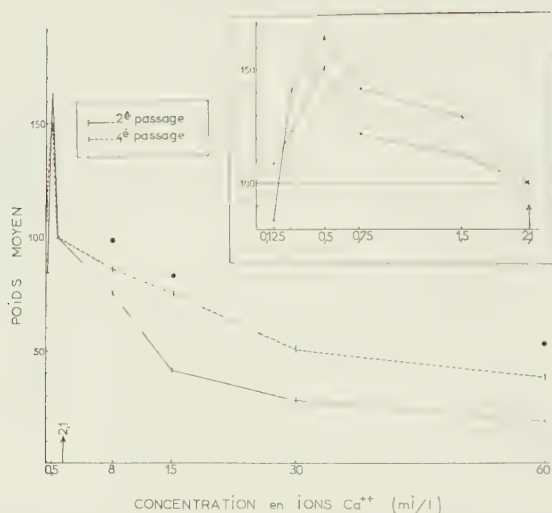


FIG. 20. — Influence des ions calcium sur l'accroissement pondéral des sporophytes de *M. d.*

En ordonnée, la valeur du poids moyen est exprimée en pour-cent de la valeur témoin, égale à 240 mg à la fin du 2^e passage et à 558 mg à la fin du 4^e passage.

Sur la figure, les points correspondent aux poids de sporophytes cultivés en présence de doses équivalentes d'ions Cl⁻.

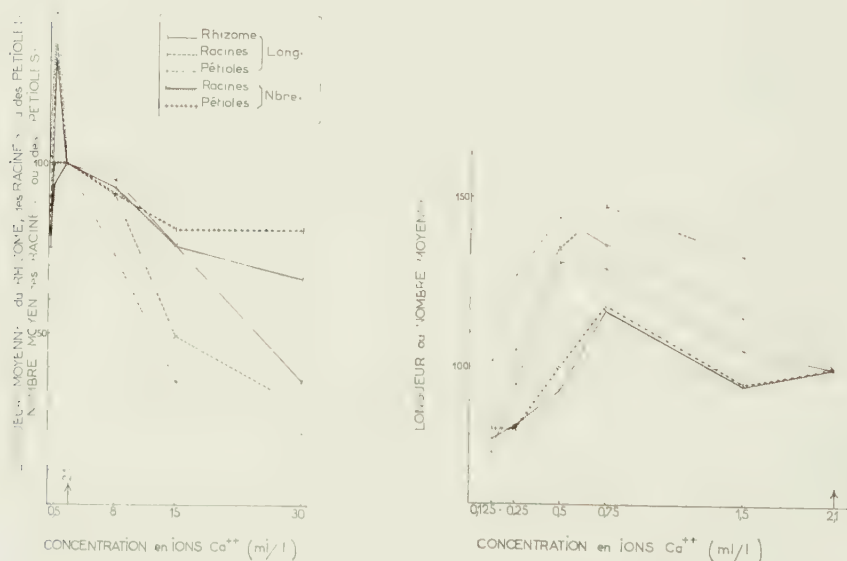


FIG. 21. — Variations, en fonction de la concentration en ions calcium, des divers caractères quantitatifs des sporophytes de 4^e passage.

En ordonnée, les valeurs de ces caractères sont exprimées en pour-cent des valeurs données par les témoins. Ces valeurs sont : longueur moyenne du rhizome, 59 mm ; longueur moyenne des racines, 1 253 mm ; longueur moyenne des pétioles, 471 mm ; nombre moyen des racines, 29 ; nombre moyen des pétioles, 10.

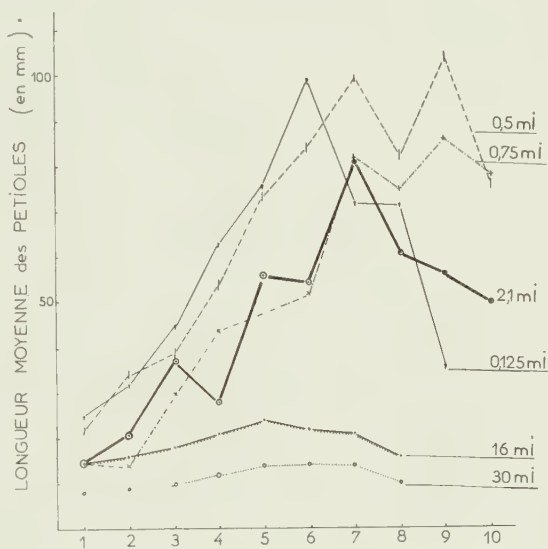
critère pondéral, ne le modifie pas. Seule la concentration légèrement supérieure (0,75 ml) l'exalte ;

— l'élongation du rhizome, des racines et des feuilles, aux variations nettement plus accentuées, suit la courbe de l'accroissement pondéral ;

— l'étude plus particulière de l'allongement moyen des pétioles, au niveau des nœuds successifs comptés de la base du rhizome à l'apex (fig. 22), montre que, au fur et à mesure de leur formation, les pétioles s'allongent de plus en plus, atteignent une hauteur maximum, puis sont moins étirés. Le parallélisme des différentes courbes, établies en fonction de la concentration en calcium du milieu, indique que ce caractère quantitatif suit la même évolution. Seul est influencée par la composition de la solution nutritive l'ampleur de cet allongement : presque nulle lorsque le calcium est fourni aux doses toxiques (16 et 30 ml), elle est la plus grande à la concentration optimale ;

— le calcul de la proportion moyenne des feuilles épanouies confirme ces observations (tableau XIII).

On voit que le développement foliaire est nettement freiné aux très faibles concentrations et aux concentrations supérieures à celle du milieu témoin. A 8 et à 16 mI, ce frein n'est pas dû aux ions chlore qui, à des



NUMERO du NOEUD, sur le RHIZOME, de la base à l'apex.

FIG. 22. — Élongation moyenne des pétioles placés aux nœuds successifs du rhizome en fonction de la concentration en ions calcium des milieux nutritifs.

En ordonnée, la longueur moyenne des pétioles est exprimée en millimètres.

TABLEAU XIII. — INFLUENCE DE LA TENEUR EN CALCIUM DU MILIEU SUR LE NOMBRE MOYEN DES FEUILLES ÉPANOUIES EXPRIMÉ EN POUR-CENT DE LA VALEUR TÉMOIN.

CONCENTRATIONS EN mI Ca ⁺⁺ LITRE.								
0,125	0,250	0,5	0,75	1,5	2,12	8	16	30
58	115	138	135	138	100	50	0	0

doses équivalentes, agissent peu ou pas du tout. L'absence de feuilles épanouies sur le milieu à 30 mI est, par contre, attribuable, au moins en partie, aux ions accompagnateurs. Les concentrations optimales favorisent la formation de ces feuilles.

Des nombreuses données quantitatives ainsi recueillies, il ressort que l'optimum de concentration en calcium se situe entre 0,250 et 0,75 mI; cependant, le milieu à 0,5 mI ayant conduit aux plus fortes moyennes de la majorité des caractères mesurés, c'est cette concentration que nous considérerons comme optimale.

3° Structure anatomique du rhizome. — Seules les coupes pratiquées dans des sporophytes cultivés en présence de 0,5 mI (optimum) et de

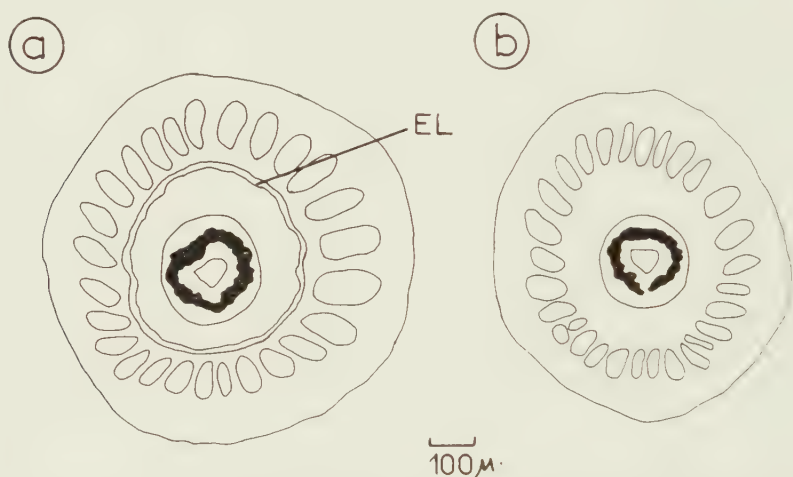


FIG. 23. — Schémas de coupes pratiquées dans les rhizomes de sporophytes cultivés en présence de la concentration optimale en ions calcium (a) et sur milieu témoin (b).

EL, épaissement lignifié de la paroi des cellules du parenchyme cortical.

60 ml (dose toxique) ont montré des modifications intéressantes. Aux autres concentrations, le diamètre et la structure du rhizome sont identiques à ceux des témoins.

a. Dans ces deux cas, l'observation des coupes faites au niveau des six premiers entre-nœuds comptés à partir de l'apex a montré que la différenciation du système vasculaire est normale : les trachéides sont toutes formées au quatrième entre-nœud.

b. Au niveau du quatrième entre-nœud :

A la concentration optimale, le diamètre du rhizome est supérieur à celui observé chez les témoins (fig. 23, comparer a et b), modification due à une augmentation du nombre des cellules ainsi que de leur taille. Très net à cet égard, le grand calibre des trachéides scalariformes et des cellules du parenchyme phloémien. La moelle compte des cellules plus nombreuses (135 p. 100 de la valeur témoin) ainsi que les endodermes

(129 p. 100). On observe, en outre, la sclérification des cellules externes du parenchyme cortical.

— *A la plus forte concentration expérimentée*, les modifications sont très importantes. Aussi envisagerons-nous leur évolution au cours des quatre passages effectués.

Au bout des premiers quarante-cinq jours, le diamètre du rhizome n'est pas changé. La solénostèle amphiphloïque comporte des trachéides scalariformes dont la paroi ne se colore pas par le vert d'iode : seuls les éléments du protoxylème, aux formes ovoïdes, sont légèrement verdâtres, défaut de coloration non attribuable au produit employé puisque les épaississements endodermiques en sont normalement imprégnés (1).

Outre ce défaut de lignification, le système vasculaire est notablement réduit : l'arc xylémien n'est plus continu, mais formé de petits tronçons séparés les uns des autres par des cellules parenchymateuses. La moelle présente une surface normale (fig. 24 a).

Au fur et à mesure que s'accroîtront les lésions provoquées par un excès de calcium, ces changements anatomiques seront plus prononcés. Le xylème sera de plus en plus réduit (en nombre plutôt qu'en taille d'éléments) : les trachéides présenteront une paroi mince, rose nacré. Parallèlement, la moelle sera moins étendue et les cellules de l'endoderme auront tendance à s'hypertrophier (fig. 24).

A la fin du quatrième passage, les trachéides, peu nombreuses, sont difficiles à distinguer des cellules qui les environnent ; la moelle est réduite, parfois, à une *seule cellule*.

On note, en outre, la présence de cellules parenchymateuses de taille anormalement grande dans le cortex.

EN RÉSUMÉ, cette étude montre que la quantité de calcium optimale pour le développement du *Marsilea* est nettement inférieure à celle contenue dans le milieu témoin.

La dose nécessaire à la prolifération normale de l'explantat est très faible : 0,01 mI/litre.

Les modifications de la morphologie, de la croissance et de la structure anatomique les plus profondes sont naturellement provoquées par l'absence ou par l'excès de l'ion considéré. Il est, à cet égard, curieux de noter des anomalies voisines dans ces deux cas : absence de feuilles épanouies, apparition sur le rhizome de formes foliaires du type juvénile, diminution de la complexité stélisque et, quoique atteignant une ampleur très différente, grossissement des bourgeons extra-axillaires suivi par leur développement plus ou moins important qui traduit des troubles de la dominance apicale. Que les deux doses extrêmes provoquent des réactions voisines, qu'elles aient donc une action convergente, montre que le calcium agit indirectement en perturbant l'état nutritif général de la plante. A l'appui de cette conclusion, on remarquera que, à toutes les concentrations

(1) D'autres réactions de mise en évidence de la lignine ont été tentées : en particulier, la réaction au phloroglucinol chlorhydrique a donné, elle aussi, un résultat négatif.

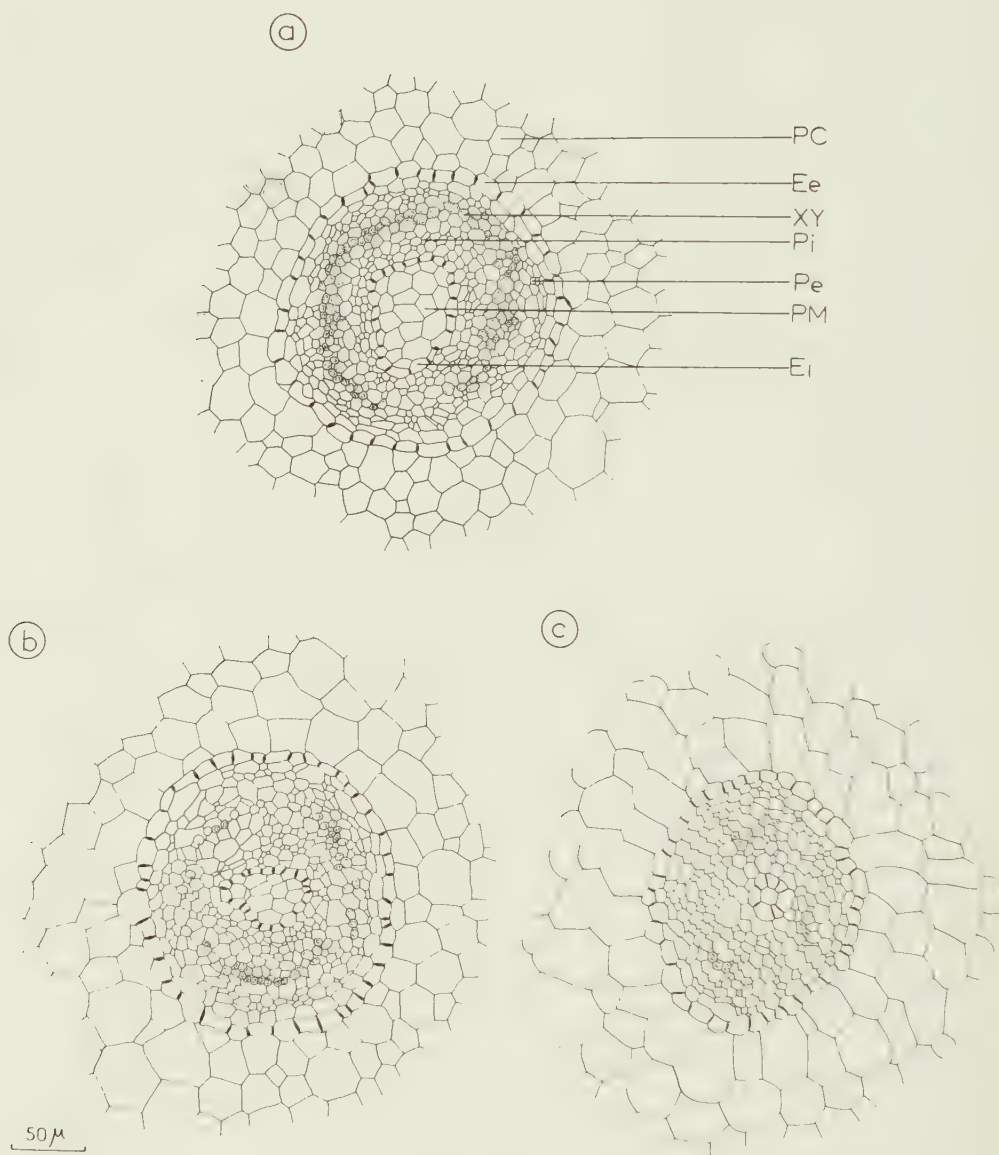


FIG. 24. — Structure stélisque du rhizome des sporophytes de *M. d.* cultivés en présence d'une forte concentration en ions calcium.

a : à la fin du 2^e passage. — *b* : à la fin du 3^e passage. — *c* : à la fin du 4^e passage.

La paroi des trachéides non colorée par le vert d'iode a été représentée par un trait pointillé (troubles de la lignification). On notera la réduction progressive du nombre des trachéides et des cellules médullaires. A la fin du 4^e passage, la moelle n'est plus représentée que par une seule cellule.

PC et *PM*, parenchymes cortical et médullaire ; *Pe* et *Pi*, phloèmes externe et interne ; *XY*, xylème ; *Ee* et *Ei*, endodermes externe et interne.

envisagées, les grandeurs mesurées varient de manière concomitante : le calcium ne modifie pas tel ou tel caractère du sporophyte isolément des autres, mais toute la culture considérée dans son ensemble.

2° Les ions magnésium.

A. — INFLUENCE DE LA CARENCE EN MAGNÉSIUM.

Le remplacement du sel de magnésium par le sel de sodium équivalent provoque l'introduction de 1 mI sodium qui ne peut être rendu responsable des modifications observées (voir p. 209).

1° Aspect morphologique. — La suppression du magnésium affecte brutalement le développement des cultures.

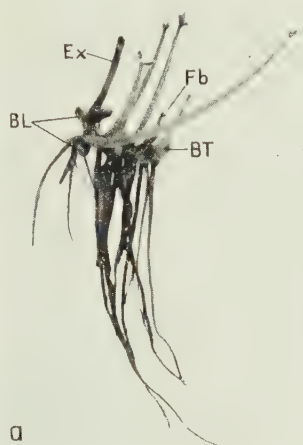
Dès le premier passage, bien que les modalités de croissance des explantats originels soient normales, les sporophytes formés en quarante-cinq jours sont chétifs (fig. 25 a).

— Le rhizome est court : les nœuds qu'il porte sont moins nombreux et très rapprochés. Il est très velu (présence de nombreux poils incolores et cassants). Brunâtre dans ses parties basale et médiane, son apex chlorotique reste le plus longtemps exempt de nécroses (1).

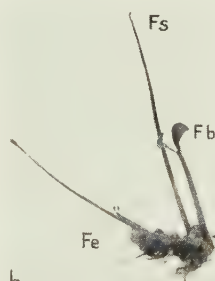
— Les racines, courtes, sont brunes et cassantes.

— Les feuilles, chlorotiques, portent des taches de nécrose localisées principalement à la base des folioles. Elles sont rudimentaires, quadrifides dans la partie la plus âgée de la culture (quatre folioles petites et transparentes) et bifides dans sa région apicale. Ainsi, la carence magnésienne agit progressivement sur la forme foliaire en provoquant un retour au type juvénile.

— Les bourgeons latéraux, non épargnés par la nécrose qui frappe les



a



b

FIG. 25. — Aspects morphologiques du sporophyte de *M. d.* carencé en magnésium ($\times 2$).

a : culture du 1^{er} passage. On remarquera le grossissement des bourgeons latéraux et la présence anormale d'une feuille bifide. — b : culture du 2^e passage. Les feuilles et les racines sont fortement sous-développées.

Ex, explantat (en b, il a été supprimé pour que la figure soit plus claire) ; *BT* et *BL*, bourgeons terminal et latéral ; *Fb*, feuille bifide ; *Fs*, feuille spatulée ; *Fe*, feuille restée à l'état d'ébauche.

(1) Divers auteurs [228-229] ont montré que le magnésium est très mobile : en cas de déficience, les traces de ce cation, apportées par l'explantat ou extra-expérimentales, se déplacent vers les régions méristématiques en voie de croissance et retardent la nécrose de l'apex principal.



FIG. 26. — Structure stélique du rhizome des sporophytes de *M. d. carencés* en magnésium.

a : à la fin du 1^{er} passage (4^e entre-nœud). — *b* et *c* : à la fin du 2^e passage (*b* : au niveau de la partie basale du rhizome ; *c* : au niveau de la partie médiane du rhizome).

On notera la réduction progressive du nombre des cellules médullaires.

PC et *PM*, parenchymes cortical et médullaire ; *Ee* et *Ei*, endoderme externe et interne ; *Pe* et *Pi*, phloèmes externe et interne ; *XY*, xylème.

organes les plus âgés, ne sont pas anormaux dans leur ensemble : seuls, les plus proches de l'explantat montrent un grossissement notable, mais ne produisent pas de feuilles visibles.

— A la fin du premier passage, la mortalité est faible (17 p. 100).

— Notons, en outre, que plus de la moitié des cultures tombent au fond des tubes, position qu'elles n'occupent jamais lorsque les conditions de vie sont favorables.

A la fin du deuxième passage, la moitié des explantats est morte. Les cultures survivantes (fig. 25 *b*) sont si minuscules que l'on doit avoir recours à l'examen sous la loupe pour les observer.

— L'apex principal est encore blanc verdâtre, les autres régions sont complètement nécrosées.

— Le rhizome, très court, porte des racines cassantes dont la longueur est extrêmement réduite.

— Les feuilles bifides localisées près de l'explantat sont relativement très allongées (1 cm à 1,5 cm) comparées aux dernières formées qui restent à l'état

d'ébauches : leur taille est si petite qu'elle est égale à celles des bourgeons placés au même nœud qu'elles.

— Ces quelques cultures ne supportent pas un troisième repiquage.

2° Accroissement pondéral. — Il découle de ces observations que, dès le premier passage, la croissance est très faible (36 p. 100 de la valeur témoin) et n'est que de 11 p. 100 à la fin du deuxième passage.

3° Structure anatomique du rhizome. — *a) A la fin du premier passage* (fig. 26 *a*), la structure reste normale en ce sens que la stèle se présente toujours sous l'aspect d'une solénostèle amphiphloïque. Les modifications observées sont dues à la réduction de la taille et du nombre des éléments constitutifs du rhizome : lacunes aérifères, trachéides, cellules parenchymateuses qui les environnent, parenchymes cortical et médullaire, éléments du phloème.

Comme dans le cas de la carence ou de l'excès en calcium, quoique plus faiblement, les cellules de l'endoderme externe sont hypertrophiées.

L'épaississement des parois de toutes les trachéides a lieu à un niveau plus proche de l'apex que chez les témoins ; cependant, cette lignification est troublée. Les éléments du métaxylème se colorent mal par le vert d'iode.

b) Plus prononcées à la fin du deuxième passage (fig. 26, *b* et *c*), les modifications de la structure du rhizome sont, en tous points, comparables. La réduction de la moelle, observée de la base du rhizome à sa région médiane, est progressive : au niveau du quatrième entre-nœud délimité par des feuilles qui sont restées à l'état d'ébauches, elle n'est plus représentée que par une seule cellule. Dans le cas de la déficience magnésienne, nous n'avons pas cependant constaté sa disparition totale.

EN RÉSUMÉ, les troubles provoqués par l'absence de magnésium prouvent que cet élément est indispensable au développement du sporophyte du *M. d.* Les manifestations en sont plus brutales que celles produites par la carence calcique, mais voisines. Dans les deux cas, on observe *le net sous-développement des feuilles et des racines avec l'apparition de formes foliaires juvéniles* et, du point de vue anatomique, *la diminution de taille du rhizome et de sa stèle dont les tissus conducteurs et la moelle sont particulièrement réduits*. Cependant, la déficience magnésienne n'entraîne pas le développement des bourgeons latéraux dont on ne note qu'épisodiquement le léger grossissement.

B. — ACTION DES IONS MAGNÉSIUM.

Les concentrations expérimentées varient de 0,1 à 60 mI. Rappelons que le milieu de référence contient 0,5 mI.

1^o Aspect morphologique. — Les concentrations inférieures à 16 ml/litre ont permis, pendant quatre passages successifs, le développement normal des explantats. Aux concentrations supérieures, les sporophytes de quarante-cinq jours sont plus grêles que les témoins ; leur rhizome est peu allongé.

— Aux deux points extrêmes de la gamme étudiée (aux doses inférieures à celle du milieu de référence, et entre 16 et 64 ml), l'apport de magnésium provoque la sénescence prématurée des organes foliaires traduite par le flétrissement et la décoloration précoce des folioles, non observés pour les doses moyennes.

— A la plus forte concentration (64 ml), le raccourcissement du rhizome est tel que les entre-nœuds ne sont plus guère visibles. Les racines, nécrotiques, sont très courtes.

Les feuilles sont plus chétives bien qu'elles soient toutes quadrifides. Certaines d'entre elles sont largement épanouies.

La mortalité pendant toute la durée de l'essai est relativement faible. A cet égard, la toxicité du magnésium est plus évidente pour les cultures

d'hiver qui poussent plus lentement (un tiers des explantats est mort avant la fin du quatrième passage) que lorsque leur état physiologique est plus satisfaisant (la mortalité ne frappe que le douzième des cultures d'été).

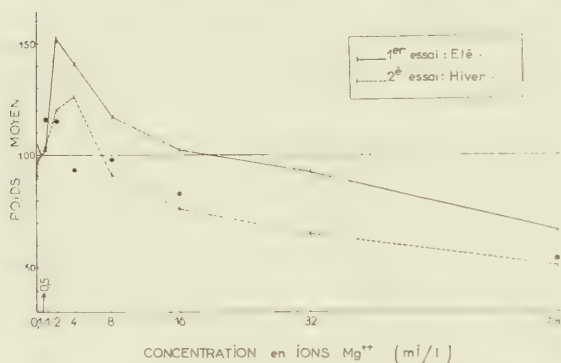


FIG. 27. — Influence des ions magnésium sur l'accroissement pondéral des sporophytes de *M. d.*

En ordonnée, la valeur du poids moyen est exprimée en pour-cent de la valeur témoin, égale à 428 mg (mois de juin) et à 299 mg (mois de novembre).

Sur la figure, les points correspondent aux poids de sporophytes cultivés en présence de doses équivalentes d'ions Cl—.

de la figure 27 fournissent des résultats voisins pour les deux séries. L'optimum de concentration se situe aux environs de 2 ou 4 ml et correspond donc à un apport en magnésium plus important que celui du milieu témoin. On remarquera que les sporophytes d'été y réagissent plus fortement que les cultures d'hiver au métabolisme plus lent. Les très faibles concentrations sont sans influence sur l'accroissement pondéral, ce qui montre que les exigences du *Marsilea* vis-à-vis du magnésium, comme vis-à-vis du calcium, sont modiques.

Il faut fournir plus de 16 ml pour restreindre efficacement la croissance,

2^o Données quantitatives.

a. **Accroissement pondéral.** — Deux essais ont été effectués : le quatrième passage de chacun d'entre eux coïncidait soit avec le mois de novembre, soit avec le mois de juin. Les données numériques que traduisent les courbes

et, là encore, la saison la plus favorable permet aux sporophytes de mieux réagir contre la toxicité d'une dose excessive d'ions magnésiens. Dans ce cas, il est cependant difficile de séparer, sur la seule base du critère pondéral, l'action propre du cation de celle de l'ion accompagnateur. A des concentrations équivalentes, la chute de croissance provoquée par les ions Cl^- est soit égale (cultures d'hiver), soit supérieure (cultures d'été) à celle produite par les ions magnésiens. Nous verrons plus loin que l'étude des autres caractères quantitatifs et anatomiques permet de séparer plus nettement, à ces doses excessives, l'action des deux ions.

b. *Autres variables.* — L'ensemble des données numériques recueillies

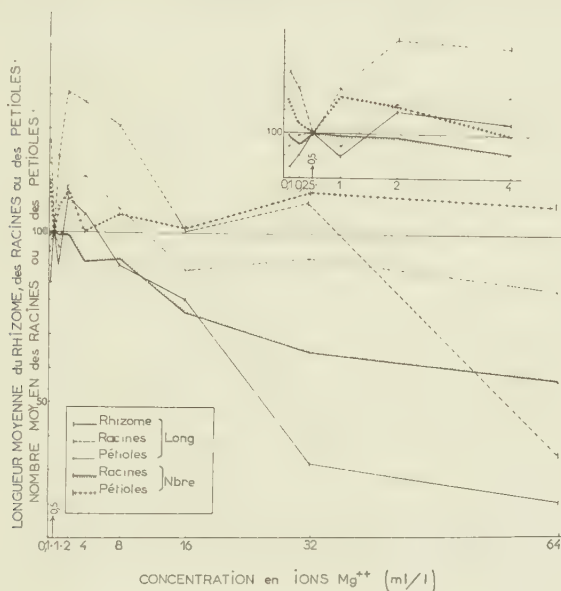


FIG. 28. — Variations, en fonction de la concentration en ions magnésium, des divers caractères quantitatifs des sporophytes de 4^e passage.

En ordonnée, les valeurs de ces caractères sont exprimées en pour-cent des valeurs données par les témoins. Ces valeurs sont : longueur moyenne du rhizome, 20 mm ; longueur moyenne des racines, 850 mm ; longueur moyenne des pétioles, 460 mm ; nombre moyen des racines, 21,9 ; nombre moyen des pétioles, 7,5.

sur les cultures d'été est schématisé par les graphiques de la figure 28. Il appelle les remarques suivantes :

— Malgré l'irrégularité de la courbe, on voit combien est peu affectée par le magnésium la formation foliaire. Le pouvoir organogène de l'apex n'est pas diminué aux doses qui se sont révélées freiner l'accroissement pondéral des plants. Cette action est propre aux ions magnésiens et traduit leur absence de toxicité : à des doses équivalentes, les ions Cl^- inhibent nettement l'initiation des feuilles (tableau XIV).

— La formation des racines ne suit pas le même processus : indifférente

TABLEAU XIV. — ACTION COMPARÉE DES IONS MAGNÉSIUM ET DES IONS CHLORE SUR LES DIVERS CARACTÈRES QUANTITATIFS DU SPOROPHYTE DE *Marsilea*.

CARACTÈRES ÉTUDIÉS.	CONCENTRATIONS EN mI Mg ⁺⁺ .					
	0,25	2	4	8	16	64
	Na + 0,5 Cl	3 Cl	7 Cl	15 Cl	31 Cl	127 Cl
Longueur du rhizome	90 <i>122</i>	110 <i>117</i>	105 <i>97</i>	90 <i>95</i>	80 <i>84</i>	20 <i>60</i>
Longueur des racines.....	120 <i>139</i>	141 <i>140</i>	138 <i>105</i>	131 <i>121</i>	100 <i>98</i>	34 <i>49</i>
Longueur des pétioles.....	99 <i>95</i>	113 <i>102</i>	116 <i>91</i>	107 <i>92</i>	88 <i>69</i>	82 <i>27</i>
Nombre des racines	95 <i>101</i>	99 <i>84</i>	91 <i>74</i>	92 <i>75</i>	76 <i>65</i>	55 <i>61</i>
Nombre des pétioles	104 <i>102</i>	112 <i>93</i>	100 <i>76</i>	105 <i>81</i>	101 <i>67</i>	109 <i>72</i>
Feuilles épanouies.....	82 <i>85</i>	148 <i>95</i>	<i>97</i>	113 <i>90</i>	91 <i>60</i>	48 <i>0</i>

Les valeurs de ces différentes variables sont exprimées en pour-cent de la valeur témoin.

En romain : actions des ions Mg.

En italique : action de « 2 Cl ».

Les chiffres imprimés en caractères gras sont ceux qui indiquent que l'action des ions magnésium est significativement différente de celle des ions « 2 Cl ».

aux faibles et moyennes concentrations, elle est progressivement diminuée au-delà de 8 mI. L'observation montre que les cultures ne comportent pas de racines internodales. Aux nœuds, ces organes sont souvent isolés (effet en partie attribuable à la présence d'ions Cl⁻).

L'élongation du rhizome est peu influencée par les concentrations faibles ou moyennes. Elle est, par contre, particulièrement sensible aux fortes doses; l'inhibition d'étirement observée est principalement due à l'ion étudié.

— Les variations présentées par la longueur moyenne des racines sont de plus grande ampleur. Exaltée aux faibles concentrations, l'élongation n'est inhibée qu'à la plus forte. La présence de deux pics séparés par un creux correspondant aux témoins est due à l'action des ions accompa-

teurs : aux très faibles concentrations, le milieu contient du sodium (1 mI) et un peu de chlore (0,2 ou 0,5 mI), soit une quantité de ClNa capable d'exalter la croissance des racines. Aux concentrations supérieures à celle contenue dans le milieu de référence, à l'action du chlore (les milieux ne contiennent pas de sodium) se surajoute l'action propre et plus importante du magnésium (1).

— La longueur des pétioles n'est pas très affectée par l'apport du cation : nous allons voir qu'il agit plus sur la forme foliaire que sur leur allongement. Seul parmi les éléments déjà étudiés (ClNa, Ca) et ceux qui le seront plus tard, il n'entrave pas, lorsqu'il est fourni à fortes doses, l'élongation pétioleaire.

— Peu influent sur l'allongement des feuilles, le magnésium modifie le nombre de celles qui atteignent leur plus haut degré de développement. Les données numériques, groupées dans le tableau XV, confirment que

TABLEAU XV. — PROPORTION MOYENNE DES FEUILLES ÉPANOUIES, EXPRIMÉE EN POUR-CENT DE LA VALEUR TÉMOIN.

CONCENTRATIONS EN mI/Mg ⁺⁺ /LITRE.								
0,1	0,25	0,51	1	2	8	16	32	64
87	82	100	105	148	113	91	74	48

l'optimum de concentration déterminé en se basant sur le poids frais correspond aussi au plus grand nombre de feuilles épanouies. A la plus forte dose employée, leur formation n'est pas totalement arrêtée, mais diminuée de moitié. A cet égard, le magnésium est beaucoup moins toxique que le chlore introduit obligatoirement (voir tableau XIV).

3° Structure anatomique du rhizome. — Seul le sporophyte cultivé en présence de la plus forte concentration a présenté des modifications intéressantes. Avant de les décrire, il n'est pas inutile de rappeler que les ions chlore ne peuvent en être rendus responsables.

— Au niveau des six premiers entre-nœuds comptés à partir de l'apex, le rhizome est hypertrophié, mais la différenciation des trachéides est normale, c'est-à-dire qu'elle n'est complète qu'au niveau du quatrième entre-nœud.

— Au niveau du quatrième entre-nœud, le diamètre du rhizome est double de celui des témoins.

Les tissus de l'écorce comportent des lacunes aérifères réduites et un

(1) Il est naturellement impossible de lever complètement le doute qui subsiste quant à l'action propre du magnésium. Son apport sous forme d'autres sels (nitrates, sulfates, phosphates) ne peut nous éclairer, car les anions cités ont des effets trop marqués, comme nous le verrons plus loin, sur le développement du *Marsilea*.

abondant parenchyme cortical (fig. 29). La stèle (fig. 30), typiquement amphiphloïque, est proportionnellement plus hypertrophiée que le rhizome considéré dans son ensemble, hypertrophie due non seulement à la plus grande taille des cellules, mais aussi à l'augmentation très appréciable de leur nombre.

Les relevés numériques effectués sur une dizaine de coupes (tableau XVI) confirment cette assertion.

TABLEAU XVI. — INFLUENCE D'UNE FORTE CONCENTRATION DE MAGNÉSIUM SUR LE NOMBRE DES CELLULES DE LA STÈLE.

NATURE DES TISSUS.	NOMBRE DE CELLULES.	
	Témoins.	64 mI Mg^{++}
Trachéïdes	53	189
Endoderme externe	58	60
Endoderme interne	22	40
Cellules médullaires :		
— normales.....	27	54
— sclérifiées.....	0	21

On remarquera que :

— L'augmentation frappante du nombre des trachéïdes (plus de 350 p. 100 de la valeur témoin) s'accompagne de leur disposition suivant plusieurs assises concentriques. L'arc xylémien n'est pas seulement plus étendu, il est aussi plus épais. Il faut noter cependant que les trachéïdes sont peu lignifiées et se colorent très mal par les réactifs de la lignine.

— La moelle comporte des cellules plus grandes et plus nombreuses : la paroi de certaines d'entre elles a subi une nette sclérification.

— Les endodermes ne sont pas modifiés de façon équivalente : le nombre des cellules de l'endoderme externe étant égal à celui des témoins, c'est leur hypertrophie qui explique l'encerclement de la stèle. L'endoderme interne comporte deux fois plus de cellules plus grandes que celles observées chez les témoins, mais moins que celles de l'endoderme externe.

EN RÉSUMÉ, le magnésium est un élément indispensable au sporophyte de *M. d.* Lorsqu'on l'en prive, il meurt rapidement. Avant de mourir, il est considérablement modifié : très chétif, il porte des racines sous-développées et des feuilles rudimentaires de type juvénile. Du point de vue anatomique, son rhizome, de faible diamètre, comporte peu de

FIG. 29. — Schéma de coupe pratiquée dans le rhizome du sporophyte de *M. d.* cultivé sur un milieu contenant 64 mI/l d'ions magnésium. Le rhizome est fortement hypertrophié; l'aérenchyme est très réduit.

LA, lacune aérifère de l'aérenchyme; Ee et Ei, endodermes externe et interne; XY, xylème; PM, parenchyme médullaire.

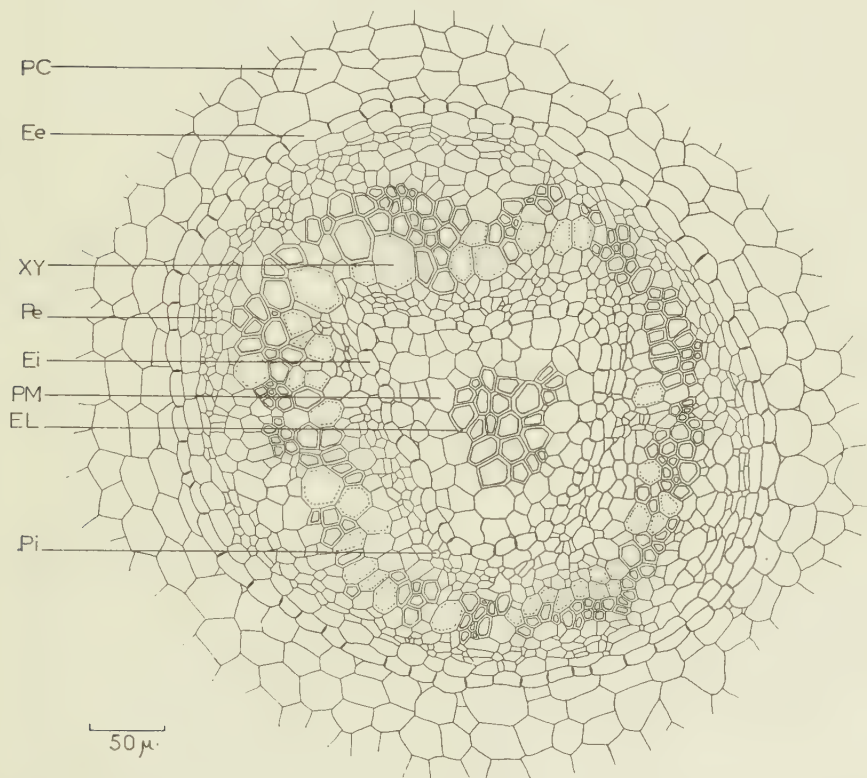
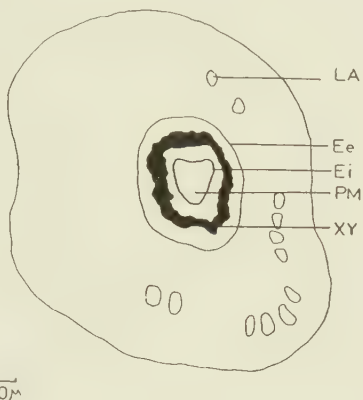


FIG. 30. — Structure stélisque du rhizome d'un sporophyte de *M. d.* cultivé en présence de 64 mI/l d'ions magnésium.

La paroi des trachéides non colorée par le vert d'iode a été représentée par un trait pointillé (troubles de la lignification).

PC et PM, parenchymes cortical et médullaire; Ee et Ei, endodermes externe et interne; Pe et Pi, phloèmes externe et interne; XY, xylème; EL, épaissement lignifié.

trachéides et la moelle est réduite au point de n'être plus représentée que par une seule cellule.

Pourtant les exigences du sporophyte de *Marsilea* sont relativement modiques : il se développe normalement sur des milieux cinq fois moins riches en magnésium que le milieu de référence. Mais, pour obtenir sa croissance maximale, il faut le cultiver sur des solutions contenant des concentrations très supérieures à celle du milieu de Knop. Le *Marsilea* tolère bien un excès de magnésium : la toxicité du cation (que nous avons tenté de différencier, pour certains critères, de celle due à la présence d'ions chlore) est relativement faible (1). Les modifications qu'elle provoque sont principalement d'ordre anatomique et consistent en une forte hypertrophie du rhizome et de sa stèle due à une augmentation de la taille ou du nombre des cellules, surtout en ce qui concerne les éléments endodermiques et les trachéides. Ces dernières, plus nombreuses, présentent cependant des troubles de la lignification de leur paroi.

3° Les ions potassium.

A. — INFLUENCE DE LA CARENCE EN POTASSIUM.

Comme dans les deux cas précédemment étudiés, les désordres observés dans le développement du sporophyte cultivé sur milieu carencé ne pourront être attribués à la présence des $2,1 \text{ mI/Na}^+$, introduits sous forme de phosphates et de nitrates en remplacement des sels équivalents de K.

1° Aspect morphologique. — Au cours des deux premiers passages, apparaissent les modifications morphologiques qui seront observées, sans grands changements, au cours des passages ultérieurs.

— Les sporophytes sont petits (fig. 31).

— Le rhizome (produit par le bourgeon latéral de l'explantat rapidement dominant ou par le bourgeon terminal) est peu étiré. Les nœuds qu'il porte sont d'autant moins espacés que l'on se rapproche de la région en voie de croissance.

— Les feuilles, toutes quadrifides, sont palmées ou enroulées en crosse. Elles sont faiblement pétiolées.

— Les racines sont courtes et épaisses.

— Les nécroses (2) sont très importantes : elles touchent l'ensemble du système racinaire et le rhizome et se manifestent sous forme de taches sur les folioles, par ailleurs chlorotiques. Elles épargnent l'apex principal et les organes initiés depuis peu. Comme le magnésium, en effet, le potas-

(1) A l'appui de cette conclusion, nous remarquerons dès maintenant que le magnésium est le seul élément que l'on peut fournir à des doses excessives sans qu'il conduise à un arrêt total de la formation des feuilles épanouies.

(2) COLEMAN et RICHARDS [59] ont montré que la nécrose typique des plantes déficientes en potassium était due à la présence d'une substance toxique, la putrescine.

sium se déplace de préférence vers les régions méristématiques en cas de déficience [127, 143, 152]. En d'autres termes, l'absence du cation provoque la sénescence prématurée de la plante.

— Cependant, la mortalité des cultures n'est pas totale bien que l'expérience ait été prolongée : à la fin du cinquième passage, les sporo-



FIG. 31. — Aspect morphologique d'un sporophyte de *M. d.* cultivé pendant 5 passages consécutif sur un milieu carencé en potassium ($\times 2$).

Les feuilles, toutes quadrifides, sont palmées ou enroulées en crosse.

phytes issus du développement des explantats apicaux demeurés chlorophylliens, quoique anormaux, sont vivants.

2° Données numériques. — a. *Accroissement pondéral.* — Les variations du poids frais au quarante-cinquième jour confirment la description précédente (tableau XVII) : la chute de croissance s'accroît jusqu'à la fin du deuxième passage, mais demeure ensuite stationnaire.

b. *Autres variables.* — Les divers caractères quantitatifs habituellement considérés n'ont pu être mesurés que parce que les sporophytes de cin-

quième passage ne présentaient pas une structure trop aberrante ni des tissus trop fragiles. Rappelons en effet que, pour les plants carencés en

TABLEAU XVII. — INFLUENCE DE CINQ PASSAGES CONSÉCUTIFS SUR MILIEU CARENCÉ EN POTASSIUM, SUR L'ACCROISSEMENT PONDÉRAL DES SPOROPHYTES DE *M. d.*

NUMÉRO DU PASSAGE.	1	2	3	4	5
Groissance en pour-cent du témoin	79	57	51	45	48

calcium, cette étude numérique aurait conduit à l'établissement de chiffres erronés et ne fut même pas tentée.

Les données sont groupées dans le tableau 18 et sont exprimées en pour-cent des valeurs témoins (les valeurs absolues sont détaillées fig. 34). On voit que les organes sont diversement touchés par la carence potassique. Mais, là encore, le nombre des racines et des feuilles est nettement moins diminué que leur élévation. Les organes verts (rhizome, pétioles) présentent une inhibition d'allongement beaucoup plus importante que les racines.

TABLEAU XVIII. — INFLUENCE DE LA CARENCE POTASSIQUE SUR LES DIVERS CARACTÈRES QUANTITATIFS DES SPOROPHYTES DE CINQUIÈME PASSAGE.

NATURE DES CARACTÈRES QUANTITATIFS.	VALEUR DES CARACTÈRES QUANTITATIFS
Longueur du rhizome	49
Longueur des racines.....	69
Longueur des pétioles.....	30
Nombre des racines	88
Nombre des pétioles	72

3^e Structure anatomique du rhizome. — La différenciation des trachéides est extrêmement rapide : à la fin du deuxième entre-nœud, elle est totale ; l'arc xylémien se présente déjà sous l'aspect qu'il aura tout le long du rhizome.

— Au niveau du quatrième entre-nœud, le rhizome et sa stèle, un peu réduits par rapport à ceux des témoins (leur diamètre est respectivement

égal à 80 et 71 p. 100 des valeurs mesurées chez ces derniers), présentent une structure tout à fait normale.

EN RÉSUMÉ, l'ensemble de ces observations montre que le potassium, quoique indispensable au développement normal du sporophyte de *M. d.*, ne semble pas être un élément aussi capital que le calcium ou le magnésium. Son absence, même prolongée, ne provoque pas la mort de toutes les cultures : certaines d'entre elles survivent à un cinquième passage. La nécessité du cation est pourtant déduite de l'observation des anomalies que présentent les plants carencés : faible croissance, sous-développement de tous les organes (rhizome, racines et feuilles), maintien du système foliaire à un stade moins évolué que celui de plants cultivés sur des milieux potassiques, sénescence prématurée, nécroses. Ces modifications de la morphologie et de la croissance ne se retrouvent pas, cependant, à l'échelle anatomique. La configuration structurale du rhizome et de sa stèle est tout à fait normale. Seule la différenciation des éléments vasculaires est nettement plus précoce que lorsque le cation est présent dans le milieu.

Que les perturbations, en cas de carence, soient moins intéressantes, moins frappantes que celles déjà décrites ou qui le seront dans les prochains chapitres, cela tient peut-être aux conditions de culture imposées par la technique de préparation de la solution nutritive. On peut se demander, en effet, si l'ion sodium introduit, voisin chimiquement du potassium, ne peut dans une certaine mesure le remplacer ou, tout au moins, retarder les effets que devrait normalement entraîner son absence. Nos expériences ne permettent pas de le préciser. On sait cependant qu'un tel remplacement est possible. HELLER [93], à la suite de très subtiles recherches effectuées sur des cultures de tissus, conclut que « l'ion Na^+ peut accomplir certaines des fonctions normalement exercées par l'ion potassium, mais non la totalité de ces fonctions : il retarde le développement de la carence en potassium sans cependant pouvoir l'empêcher ». C'est à un résultat semblable qu'aboutissent ULRICH et OHKI [200], expérimentant sur la betterave sucrière.

B. — ACTION DES IONS POTASSIUM.

Les concentrations expérimentées varient de 0,5 à 120 mI. Le milieu de référence contient 2,16 mI/litre.

1° Aspect morphologique. — A la plus forte dose (120 mI), la mort des explantats en voie de développement survient quinze jours après le premier repiquage.

— Aucune des autres concentrations ne conduit, au cours de cinq passages consécutifs, à des malformations du sporophyte. Sa taille est beaucoup plus affectée que sa forme.

— Les différents organes sont bien rectilignes et normalement pigmentés.

A peine note-t-on un léger brunissement des racines au-delà de 16 mI.



FIG. 32. — Aspect morphologique d'un sporophyte de *M. d.* cultivé pendant 5 passages consécutifs sur un milieu très riche en potassium (60 mI/l) ($\times 2$).

On notera l'absence de feuilles épanouies.

Les feuilles sont toutes quadrifides. Aux concentrations inférieures à celle du milieu de référence, les folioles sont largement déployées. Au-delà, la forme palmée domine sans que, toutefois, la forme épanouie disparaisse totalement.

La figure 32 montre un sporophyte cultivé en présence de la plus forte concentration permettant la vie.

— Quel que soit l'apport en potassium, la mortalité des cultures est nulle.

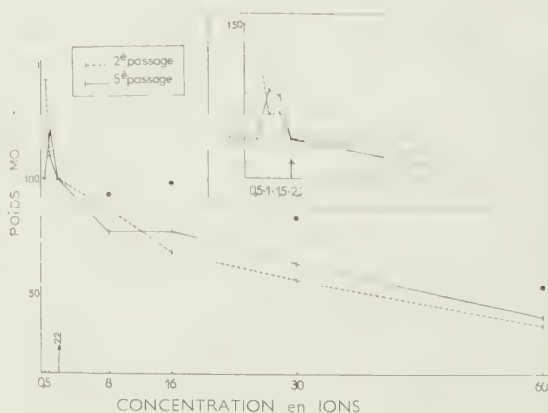
2^o Données quantitatives.

a. *Accroissement pondéral.* — Aux concentrations inférieures à celle du milieu témoin, la croissance est exaltée. Cependant, la plus faible dose (0,5 mI), optimale à la fin du deuxième passage, se révèle inefficace par la suite. C'est une dose double de potassium qu'il faut alors fournir pour augmenter légèrement le poids des plants (fig. 33). Les calculs statistiques ont montré que l'augmentation est significative, quoique faiblement.

FIG. 33. — Influence des ions potassium sur l'accroissement pondéral des sporophytes de *M. d.*

En ordonnée, le poids moyen est exprimé en pour-cent du poids des sporophytes témoins. Ce poids est égal à 371 mg à la fin du 2^e passage et à 439 mg à la fin du 5^e passage.

Sur la figure, les points correspondent aux poids de sporophytes cultivés en présence de doses équivalentes d'ion Cl⁻.



— Au-delà de 8 mI, le poids diminue nettement, quelle que soit la durée de l'expérience. Cette chute de croissance est bien provoquée par l'excès des ions potassiques, les doses équivalentes d'ions chlore s'étant révélées nettement moins toxiques.

b. *Autres variables.* —

Les courbes de la figure 34 schématisent l'étude numérique des différents caractères quantitatifs étudiés et confirment les observations précédentes. On remarquera que l'exaltation de croissance constatée précédemment s'explique par l'élongation des organes portés par le rhizome plus que par l'augmentation de leur nombre, élongation plus marquée pour les racines que pour les pétioles. (N'est-elle pas, au moins en partie, attribuable à la présence des ions accompagnateurs présents dans le milieu ?)

Aux plus fortes concentrations, le pouvoir organogène de l'apex principal, explicité par le nombre d'organes qu'il initie en quarante-cinq jours, est moins sensible à l'apport de doses excessives de potassium que le développement ultérieur de ces organes. La toxicité du cation s'exerce surtout sur l'allongement pétioleaire.

Le potassium, à la dose optimale, favorise la formation des feuilles quadrifides épanouies (tableau XIX). La diminution de leur nombre (qui n'est cependant jamais nul) est corrélative de l'augmentation progressive de la concentration.

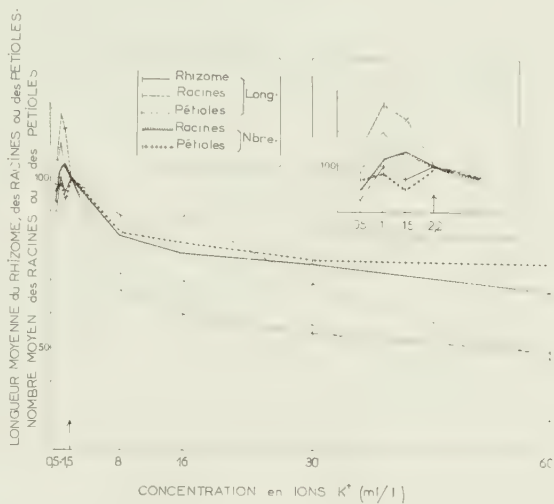


FIG. 34. — Variations, en fonction de la concentration en ions potassium, des divers caractères quantitatifs des sporophytes de 5^e passage.

En ordonnée, les valeurs de ces caractères sont exprimées en pour-cent des valeurs données par les témoins. Ces valeurs sont : longueur moyenne du rhizome, 26,6 mm ; longueur moyenne des racines, 1 124 mm ; longueur moyenne des pétioles, 627 mm ; nombre moyen des racines, 22,8 ; nombre moyen des pétioles, 8,3.

TABLEAU XIX. — PROPORTION MOYENNE DES FEUILLES ÉPANOUIES EXPRIMÉE EN POUR-CENT DE LA VALEUR TÉMOIN.

CONCENTRATIONS EN ml K/L.							
0,5	1	1,5	2,16	8	16	30	60
100	117	100	100	54	58	42	18

3^o *Structure anatomique du rhizome.* — Les modifications produites par le potassium sont peu importantes. Dans tous les cas, la structure anatomique est normale. A peine note-t-on une réduction du calibre de l'axe principal.

Pour nous en assurer, nous avons systématiquement mesuré le grand diamètre des coupes pratiquées sur des sporophytes de cinquième passage, cultivés en présence de chacune des concentrations étudiées (tableau XX) : les variations sont de faible amplitude. La stèle a tendance, dans tous les cas, à être plus réduite que le rhizome pris dans son ensemble. Cette

TABLEAU XX. — INFLUENCE DU POTASSIUM SUR LE DIAMÈTRE DU RHIZOME ET DE SA STÈLE.

DIAMÈTRES (exprimés en % des valeurs témoins).	CONCENTRATIONS EN mI K L.							
	0,5	1	1,5	2,16	8	16	30	60
Rhizome	96	104	96	100	99	97	99	78
Stèle	87	98	95	100	93	98	86	65

remarque s'applique tout particulièrement aux deux extrémités de la gamme expérimentée.

EN RÉSUMÉ, la carence en potassium n'a pas provoqué de changements aussi spectaculaires que ceux dus à l'absence des deux cations déjà étudiés. Nous avons vu que l'on peut, semble-t-il, attribuer à l'ion sodium présent dans le milieu le peu d'ampleur de ces réactions. Il est cependant impossible de nier le rôle du potassium sur la croissance générale des plants de *M. d.* En effet, en cas de carence ou d'excès, les sporophytes doivent être considérés comme aberrants, puisque leurs divers organes sont moins développés et légèrement moins nombreux que ceux des témoins.

Mais, à toutes les doses expérimentées, on ne peut le rendre responsable de malformations : on ne constate jamais le développement des bourgeons latéraux (comme dans le cas du calcium) ou l'apparition de feuilles du type juvénile (comme en cas de carence en Ca^{++} et en Mg^{++} , ou en cas d'excès de calcium), ou bien encore une modification de la structure anatomique du rhizome (carence ou excès de calcium, de magnésium).

Le *Marsilea*, qui a besoin de potassium pour effectuer son développement normal, le tolère dans de larges limites de concentrations (de 0,5 à 8 mI). C'est que le potassium est relativement peu toxique. Il paraît agir plutôt sur la dimension des cellules provoquant du nanisme que sur l'organisation générale de la plante.

4^o Les ions nitriques et ammoniacaux.

Dans ce paragraphe, nous envisagerons l'action des ions nitriques sur le sporophyte de *M. d.* Les phénomènes provoqués par leur absence nous ont conduit à étudier leur remplacement par les sels d'ammonium. Nous n'avons pas abordé le problème de la nutrition nitro-ammoniacale.

A. — INFLUENCE DE LA CARENCE NITRIQUE.

1^o Aspect morphologique et croissance. — Les deux nitrates du milieu témoin ont été remplacés par les chlorures équivalents (l'introduction de 6,4 ml Cl⁻ ne pourra être rendue responsable des troubles observés) : les résultats obtenus correspondront donc à ceux que produit la suppression totale de toute source d'azote.

Les lésions que provoque la carence sont si rapides que les sporophytes ne survivent pas au-delà du vingt-cinquième jour après leur mise en culture. La mort ne les frappe cependant qu'après que les explantats aient formé un rudiment de rhizome (fig. 35). Les feuilles, bien que quadrifides, restent à l'état d'ébauches. Elles sont peu nombreuses.

Chaque culture comporte cependant une à deux feuilles un peu plus développées, localisées près de l'explantat : ce sont évidemment celles qui étaient initiées dans le bourgeon avant son ensemencement. L'absence d'azote se traduit par l'arrêt rapide de leur développement.

Les racines sont, proportionnellement aux autres organes, longues et fines : elles sont pourvues de nombreuses racines secondaires. L'ensemble des organes néo-formés est complètement nécrotique.

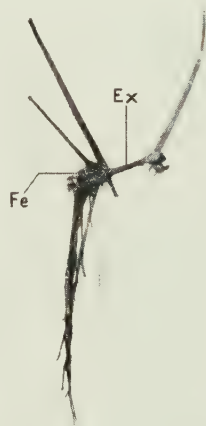


FIG. 35. — Aspect morphologique d'un sporophyte de *M. d.* carencé en azote ($\times 2$).

Au 25^e jour, la culture est morte. Les feuilles, peu nombreuses, restent à l'état d'ébauches.

Ex, explantat ; *Fe*, feuille à l'état d'ébauche.

2^o Structure anatomique du rhizome. — Ces modifications morphologiques s'accompagnent de modifications anatomiques que nous avons observées dans la partie médiane du rudiment de rhizome, à un niveau équivalant au deuxième ou troisième entre-nœud.

— La présence d'un arc xylémien complètement lignifié indique que la différenciation des trachéides a lieu dans une région plus proche du bourgeon terminal que lorsque les nitrates sont fournis à la plante.

— La taille du rhizome est plus réduite que celle de sa stèle (leurs

diamètres équivalent respectivement à 80 et 95 p. 100 des valeurs mesurées sur l'axe des témoins cultivés au cours du même essai). Cette diminution est due à la réduction sensible des lacunes aérifères et du nombre des assises constituant le parenchyme cortical. La stèle (fig. 36), entourée par un endoderme dont les cellules sont légèrement hypertrophiées, comporte

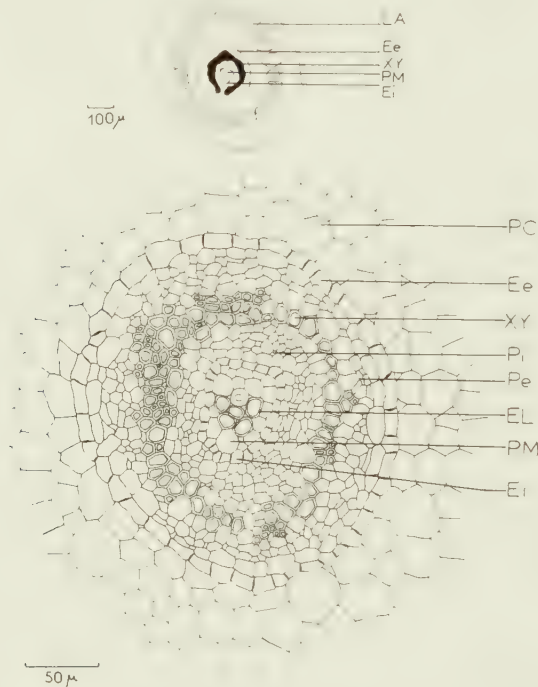


FIG. 36. — Structure anatomique du rhizome d'un sporophyte de *M. d.* carencé en azote.

La coupe a été pratiquée dans la partie médiane du rudiment de rhizome. Noter l'intense vascularisation de la stèle (trachéides très nombreuses mais de petit calibre), l'hypertrophie des cellules de l'endoderme externe et la sclérification des cellules médullaires centrales.

LA, lacune aérifère de l'aérenchyme ; PC et PM, parenchyms cortical et médullaire ; Ee et Ei, endodermes externe et interne ; Pe et Pi, phloèmes externe et interne ; XY, xylème ; EL, épaissement lignifié.

des trachéides nombreuses, petites, disposées sur deux ou trois rangées, et dont la paroi est intensément colorée par le vert d'iode. Parallèlement à cette vascularisation anormalement intense, on note la réduction du nombre des éléments phloémiens, concomitante de l'augmentation sensible de leur taille.

La paroi de quelques cellules médullaires est sclérifiée : les plus centrales ne présentent plus qu'une lumière à peu près inexistante.

La sensibilité du *Marsilea* à l'absence d'azote montre combien cet élément lui est indispensable. La rapidité des effets qu'elle provoque explique que les modifications morphologiques et anatomiques soient moins intéressantes que celles déjà étudiées.

B. — ACTION DES IONS NITRIQUES.

Les concentrations expérimentées s'échelonnent de 0,5 à 100 mI/litre. Les observations ont porté sur les points habituels.

1^o Aspect morphologique. — La physionomie des sporophytes, au cours de quatre passages consécutifs, est normale tant que la concentration en ions nitriques ne dépasse pas 10 mI, soit une teneur double de celle présente dans le milieu témoin. Toutefois, les racines portées par les plants cultivés sur les milieux les plus pauvres en nitrates sont épaisses et pourvues de nombreuses ramifications (1) latérales.

— Au-delà de 10 mI, les modifications se traduisent par la présence de feuilles de plus en plus petites, normalement pigmentées, et de racines de plus en plus courtes, nécrosées et cassantes. Ces organes moins développés sont aussi moins nombreux. Conjointement, les feuilles palmées, puis en forme de crosse, vont être dominantes.

— Aucune des doses expérimentées n'a conduit à la mort des cultures.

2^o Données quantitatives. — a. *Accroissement pondéral.* — Les mesures effectuées en cours et en fin d'expérience ont fourni des résultats concordants (fig. 37).

— Aux deux plus faibles concentrations, les nitrates sont suffisants pour assurer une croissance pondérale normale des plants.

— L'optimum de concentration se situe à 4 mI, valeur un peu moins élevée que celle du milieu témoin (5,5 mI). Celui-ci contient une dose qu'il ne faut pas dépasser. En effet, aux concentrations plus fortes (au-delà de 8 mI), les ions nitriques sont nettement toxiques. La chute de croissance qu'ils occasionnent n'est qu'en faible partie imputable aux ions

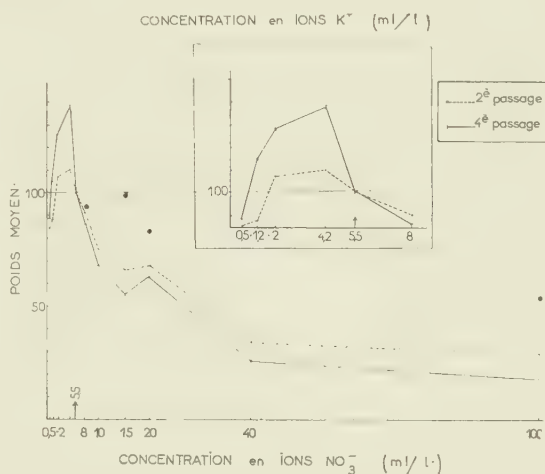


FIG. 37. — Influence des ions nitriques sur l'accroissement pondéral des sporophytes de *M. d.*

En ordonnée, le poids moyen est exprimé en pour-cent de la valeur témoin égale à 685 mg à la fin du 2^e passage et à 392 mg à la fin du 4^e passage.

Sur la figure, les points correspondent aux poids de sporophytes cultivés en présence de doses équivalentes d'ions Na⁺.

(1) Les effets provoqués par la déficience en azote sur le système racinaire du *Marsilea* sont semblables à ceux observés sur d'autres végétaux : graminées (BLANC [33]), pois, *Lepidum*, *Linum*, *Raphanus* (WIERSUM [227], blé ; ROSEMARK [39]).

sodium, beaucoup moins nocifs. Il est important de remarquer que la tolérance du *Marsilea* aux ions nitriques est cependant assez grande puisque la mortalité, à la fin du quatrième passage, est nulle.

b. *Autres variables.* — L'étude détaillée des autres caractères quantitatifs apporte quelques précisions intéressantes, surtout en ce qui concerne

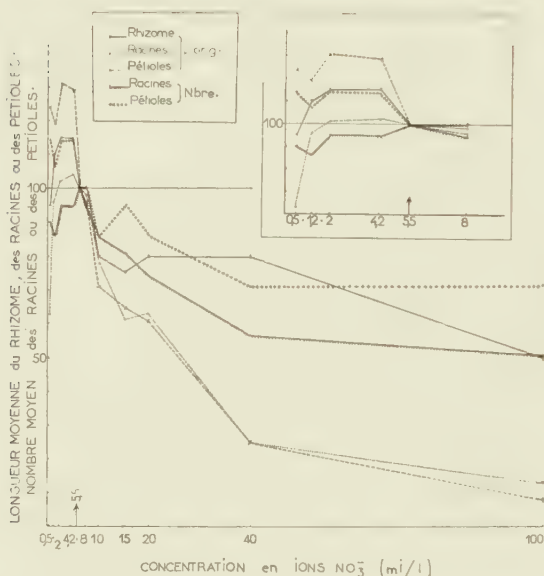


FIG. 38. — Variations, en fonction de la concentration en ions nitriques, des divers caractères quantitatifs de sporophytes de 4^e passage.

En ordonnée, les valeurs de ces caractères sont exprimées en pour-cent des valeurs données par les témoins. Ces valeurs sont : longueur moyenne du rhizome, 20 mm ; longueur moyenne des racines, 890 mm ; longueur moyenne des pétioles, 456 mm ; nombre moyen des racines, 21 ; nombre moyen des pétioles, 7.

En ordonnée, les valeurs de ces caractères sont exprimées en pour-cent des valeurs données par les témoins. Ces valeurs sont : longueur moyenne du rhizome, 20 mm ; longueur moyenne des racines, 890 mm ; longueur moyenne des pétioles, 456 mm ; nombre moyen des racines, 21 ; nombre moyen des pétioles, 7.

— L'optimum de concentration correspond, au total, à des racines nettement plus longues et moins nombreuses, un rhizome plus étiré et des pétioles normalement développés, mais plus nombreux. Le tableau XXI indique par ailleurs qu'il ne modifie pas la proportion des feuilles épanouies. Seuls les apports plus faibles exaltent leur formation. A la plus

les milieux plus faiblement pourvus en NO_3^- que le milieu témoin (fig. 38). En effet, pour les plus fortes concentrations, le faisceau de courbes indique que, d'une part, l'élongation du rhizome est moins inhibée que celle des organes qu'il porte et que, d'autre part, le nombre des feuilles est moins diminué que le nombre des racines (absence des racines internodales, en particulier).

Au-dessous de 5,5 ml (milieu témoin), les différents caractères ne varient pas de manière parallèle.

— La présence d'un système racinaire abondant aux deux plus faibles concentrations résulte de l'élongation des racines et non de l'augmentation de leur nombre. En outre, leur épaisseur et la présence de nombreuses racines laté-

TABLEAU XXI. — INFLUENCE DES IONS NITRIQUES SUR LA FORMATION DES FEUILLES ÉPANOUIES. (VALEURS EXPRIMÉES EN POUR-CENT PAR RAPPORT AUX TÉMOINS.)

CONCENTRATIONS EN mI NO ₃ /L.										
0,5	1,237	2	4,234	5,471	8	10	15	20	40	100
37	128	144	100	100	94	56	11	14	0	0

faible concentration et au-delà de 8 mI, les feuilles épanouies sont peu nombreuses; elles sont totalement absentes à 40 et 100 mI.

3° *Structure anatomique du rhizome.* — L'observation des coupes pratiquées sur tous les lots de sporophytes a montré que les nitrates ne modifient pas la structure du rhizome et n'influent légèrement sur sa taille qu'à partir de 40 mI (tableau XXII).

TABLEAU XXII. — INFLUENCE DES IONS NITRIQUES SUR LA TAILLE DU RHIZOME ET DE SA STÈLE (SPOROPHYTES DE QUATRIÈME PASSAGE).

DIAMÈTRES (exprimés en % des valeurs témoins).	CONCENTRATIONS EN NO ₃ ⁻ mI/L.									
	0,5	1,37	2	4,234	5,471	8	10	15	40	100
Rhizome	109	102	100	107	100	100	95	98	77	91
Stèle.....	107	100	100	107	100	107	107	100	71	79

Même à la plus forte concentration, les changements sont peu notables : la stèle, plus petite, comporte des éléments conducteurs moins développés : en particulier, les trachéides, moins nombreuses, sont de petit calibre.

C. — APPORT D'AZOTE SOUS FORME AMMONIACALE.

Les résultats présentés au début de ce chapitre ont montré que l'azote est absolument nécessaire à la vie du sporophyte de *Marsilea*. Mais ils ne précisent pas sous quelle forme on peut le lui fournir. Un essai fut donc entrepris en vue de déterminer dans quelle mesure la forme ammoniacale peut assurer son développement. L'addition de chlorure d'ammonium à un milieu dépourvu de nitrates, dans une gamme de concentration s'éche-

sont du type palmé. Seules les doses faibles (2 et 4 ml) permettent l'épanouissement de quelques-unes d'entre elles.

A LA FIN DU TROISIÈME PASSAGE, tous les explantats sont morts, à l'exception de ceux cultivés en présence de 0,5 ml. Ceux-là se sont développés en sporophytes petits, chlorophylliens et trapus. Les feuilles sont toutes quadrifides (palmées ou enroulées en crosse).

2° *Accroissement pondéral.* — Les résultats numériques (tableau XXIII) précisent nos descriptions : bornons-nous à signaler que la croissance est très appréciable au cours du premier passage bien que moins intense que chez les témoins. Les conditions les moins défavorables sont celles fournies par les milieux pourvus de 2 ou 4 ml. A la fin du deuxième passage, la croissance est d'autant plus inhibée que le milieu est plus riche en ions ammoniacaux. La toxicité rapidement atteinte de ces derniers se traduit par la faible croissance des quelques plants survivant à un troisième passage.

3° *Structure anatomique du rhizome.* — L'étude en a été réalisée sur les plants vivants de deuxième passage.

Seule la plus faible concentration ne modifie pas la configuration anatomique du rhizome.

— Au-delà, à des doses comprises entre 1 et 5,5 ml, le diamètre du rhizome est normal (fig. 39). La solénostèle comporte des trachéides à paroi très épaissie et moins intensément imprégnée par le colorant. La moelle est représentée par un petit nombre de cellules à lumière réduite par un abondant dépôt de cellulose.

— Ces modifications atteignent des proportions démesurées dans les rhizomes des plants cultivés en présence des plus fortes concentrations (entre 10 et 30 ml). L'hypertrophie du rhizome est telle que son diamètre est double de celui des témoins (fig. 40). Les tissus périphériques et de l'écorce interne sont abondants : le parenchyme cortical présente de place en place des cellules de grande taille. Par contre, les lacunes aérifères extrêmement réduites sont parfois indiscernables. La stèle est proportionnellement aussi hypertrophiée, hypertrophie due principalement à l'augmentation de taille de ses constituants : les endodermes, la moelle comportent exactement le même nombre de cellules que les témoins. Seul, le xylème est représenté par trois fois plus de trachéides disposées sur plusieurs assises. Leur paroi se colore très irrégulièrement par le vert d'iode, ce qui traduit un retard (ou un blocage) de leur lignification. La paroi des cellules médullaires est fortement épaissie par de la cellulose.

De cette étude, il ressort que l'ion ammonium est capable d'être, très momentanément il est vrai, la seule source d'azote du milieu nutritif. Il

retarde efficacement la mort des cultures. Mais il se révèle particulièrement toxique s'il est fourni de manière un peu durable. Il lèse spécialement le système racinaire, réaction immédiate de plants dont les autres organes se modifient plus progressivement. Les ions ammoniacaux doivent

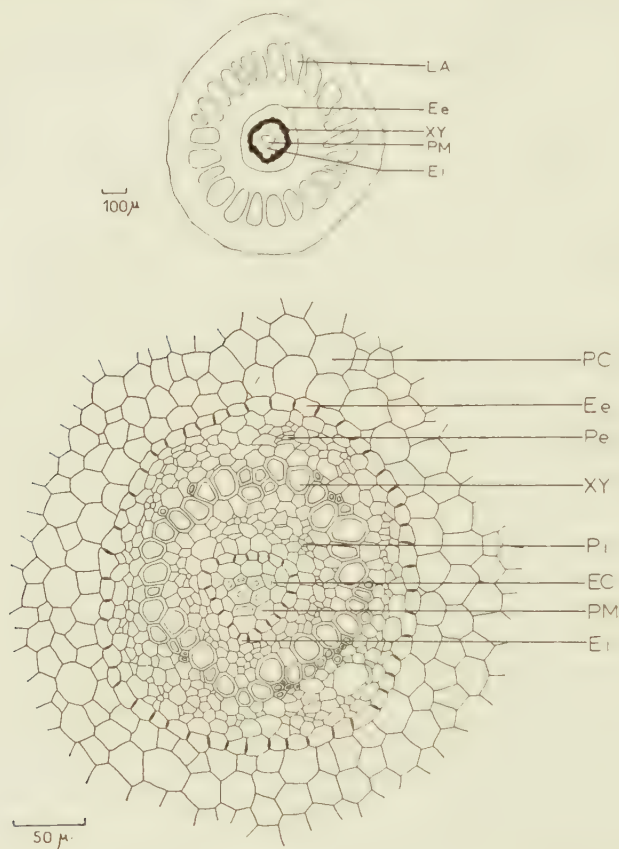


FIG. 39. — Structure anatomique du rhizome d'un sporophyte de 2^e passage cultivé en présence de 5,5 mI/l d'ions ammonium.

LA, lacune aérifère de l'aérenchyme ; *PC* et *PM*, parenchymes cortical et médullaire ; *Ee* et *Ei*, endodermes externe et interne ; *Pe* et *Pi*, phloèmes externe et interne ; *XY*, xylème ; *EC*, épaississement cellulosique.

être considérés comme seuls responsables des lésions observées au niveau des racines. En effet, il est impossible de les attribuer aux ions Cl^- (cf. p. 209). Nous avons vu, par ailleurs, que les nitrates, aux faibles doses tout au moins, produisent des effets inverses. C'est donc bien parce que l'azote est fourni sous forme ammoniacale que l'on observe cette anomalie, et non pas parce qu'elle représente la seule source d'azote.

Il aurait été intéressant de rechercher si cette action est directe ou si les ions NH_4^+ n'agissent pas indirectement : non toxiques par eux-mêmes,

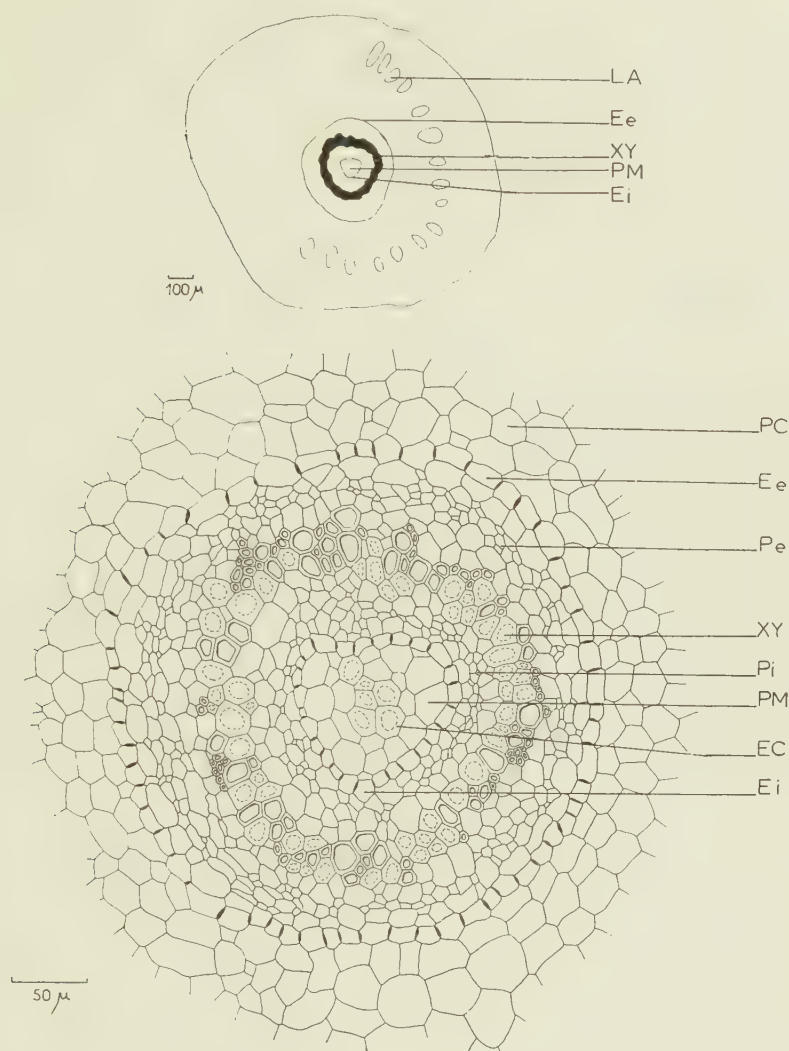


FIG. 40. — Structure anatomique du rhizome d'un sporophyte de 2^e passage cultivé en présence de 30 mI/l d'ions ammonium.

On notera l'hypertrophie des cellules de l'endoderme externe et l'épaississement de la paroi des cellules médullaires par suite d'un dépôt de cellulose. La paroi des trachéides non colorée par le vert d'iode a été représentée par un trait pointillé (troubles de la lignification).

Mêmes légendes que pour la figure 39.

c'est leur absorption qui provoquerait une forte acidification du milieu nutritif très nuisible (1).

A cet égard, il est curieux de remarquer que les sporophytes de quarante-

(1) SMITH [174], étudiant la nutrition ammoniacale de jeunes plantules de *Citrus*, répond par l'affirmative : en présence d'ions NH_4^+ , l'acidification du milieu conduit à la faible croissance du végétal ainsi traité.

cinq jours cultivés sur solutions ammoniacales sont incapables de neutraliser le milieu comme le font les cultures normales. Aussi est-il intéressant de rapprocher nos observations actuelles de celles exposées page 201, lors de l'étude du *pH* du milieu complet : à *pH* 3, comme dans le cas présent, la morphologie et le développement des racines sont tout à fait identiques et sont, de tous les organes du sporophyte, les premiers à être modifiés.

EN RÉSUMÉ, les sporophytes de *M. d.*, comme tous les végétaux, sont rapidement sensibles à l'absence d'azote. Lorsqu'ils en sont privés, ils ne survivent pas au-delà du vingt-cinquième jour suivant leur ensemencement. Les organes formés pendant ce court laps de temps sont naturellement aberrants : rhizome rudimentaire intensément vascularisé, feuilles restées à l'état d'ébauches, racines peu développées et pourvues de nombreuses racines latérales.

Indispensable, l'azote ne doit pas cependant être fourni, sous forme de nitrates, en trop grande quantité. Les exigences du *Marsilea* sont, là encore, relativement modiques ; pour obtenir son développement maximum, il faut lui fournir une dose un peu moins forte que celle du milieu témoin. Au-delà, les ions nitriques sont toxiques et conduisent à des modifications de l'aspect extérieur et de la croissance : absence de feuilles épanouies, racines courtes, nécroses, faible accroissement pondéral. Les anomalies ne se reflètent pas, cependant, sur la structure anatomique du rhizome, qui reste normale. En d'autres termes, *les caractères anatomiques de la plante (caractères internes) sont plus stables que ses caractères morphologiques (caractères externes)*.

L'ensemble de ces résultats a été complété par l'étude de l'action des ions ammoniacaux. Ainsi avons-nous pu préciser que, en l'absence d'azote nitrique, l'azote ammoniacal ne permet de pallier les effets auxquels elle aboutit si brutalement que très momentanément : la forte toxicité des ions NH_4^+ , même lorsqu'ils sont employés à très faibles concentrations, est rapidement ressentie, surtout par les racines. Les sporophytes sont anormaux du triple point de vue de leur morphologie, de leur croissance et de la structure anatomique de leur rhizome. Les lésions observées aboutissent, à brève échéance, à la mort des cultures.

5° Les ions sulfuriques.

A. — INFLUENCE DE LA CARENCE EN SOUFRE.

L'ion Cl^- présent dans le milieu dépourvu de soufre (remplacement du sulfate par le chlorure de magnésium) ne peut modifier le développement du sporophyte. Les anomalies décrites seront donc entièrement attribuables à l'absence de l'anion.

1^o Aspect morphologique et croissance. — Au cours des quatre passages effectués, le mode de développement des explantats est normal, mais la physionomie des sporophytes qui en dérivent est rapidement aberrante.

— Dès le premier passage, les cultures diffèrent des témoins par l'absence totale de feuilles épanouies : les feuilles formées sont toutes palmées.

Les racines et le rhizome demeurent normaux, ainsi que la pigmentation des différents organes. En effet, le raccourcissement des racines, leur brunissement, la chlorose des feuilles n'apparaissent que plus tardivement : au cours du deuxième et du troisième passage.

— A la fin du quatrième, les modifications les plus intéressantes portent sur la forme des feuilles, successivement formées (leur nombre reste le même que chez les témoins).

Les premières sont palmées (fig. 41) : leur petitesse et la disposition de leurs quatre folioles indiquent que leur développement s'est arrêté très tôt. Viennent ensuite une à deux feuilles *bifides*, puis des feuilles *spatulées* et à nouveau des feuilles *bifides*. Comment expliquer une telle succession ?

On peut supposer que les seules feuilles quadrifides observées, les premières formées après le repiquage, étaient déjà normalement différenciées dans le bourgeon (latéral ou apical) porté par l'explantat. Aussitôt après l'ensemencement, qui constitue un choc défavorable, les ébauches foliaires, initiées par l'apex qui n'a pas modifié son pouvoir organogène, ne sont pas capables de se développer et d'atteindre la forme quadrifide normale. Perdant de plus en plus précocement leurs caractères méristématiques, elles sont de plus en plus simples : bi- puis unifoliolées. Puis, lorsque le sporophyte s'accoutume à ses conditions de culture, les primordiums foliaires nouvellement formés à l'apex se di-



FIG. 41. — Aspect morphologique d'un sporophyte de *M. d.* cultivé pendant 4 passages sur un milieu dépourvu de soufre, puis transplanté sur un milieu contenant 0,1 mI/l d'ions sulfuriques ($\times 2$).

La partie de la culture figurée à gauche de la flèche s'est développée après la transplantation. On notera la forme des feuilles successivement apparues sur le rhizome. Sur milieu carencé en soufre, elles sont quadrifides (1 et 2), bifide (3), spatulées (4, 5, 6), puis à nouveau bifides (7 et 8). Après la transplantation sur milieu complet, les feuilles sont toutes quadrifides palmées.

Ex, emplacement de l'explantat ; BT, bourgeon terminal.

visent à nouveau plus longtemps : les feuilles sont un peu plus complexes.

En même temps, les racines, inhibées dans leur croissance, ne sont plus aptes à assurer l'alimentation de toute la plante.

Mises en présence d'une faible dose d'ions sulfuriques (0,1 ml), ces cultures forment à nouveau des feuilles quadrifides palmées en même temps que se développe un faisceau de racines plus important (fig. 41, partie gauche) : l'ensemble du sporophyte rappelle alors étrangement la jeune plantule décrite tout au début de ce travail.

Cette succession de deux phases dans le développement foliaire — d'abord régression vers les types juvéniles, puis retour partiel au normal — indique peut-être, de la part du sporophyte un phénomène d'accoutumance au manque de soufre. Quel qu'en soit le mécanisme réel, ce phénomène montre clairement l'importance du soufre dans la morphogenèse foliaire, et l'on peut conclure de ces observations que le soufre règle (directement ou indirectement) la forme des feuilles. En sa présence, ces dernières réacquièrent le pouvoir de se développer plus activement ou plus longtemps : elles sont alors quadrifoliolées.

— Les explantats de cinquième repiquage ne survivent pas. Ainsi, la mortalité des cultures, nulle au cours des deux premiers passages et relativement peu importante au cours des deux suivants (57 et 58 p. 100), est totale si l'on poursuit l'expérience.

— L'accroissement pondéral des sporophytes vivants indique mieux que la mortalité combien ils souffrent rapidement de la carence : diminué de moitié au début de l'essai, il n'est plus que de 26 % (de la valeur témoin) à la fin du 4^e passage.

2^o Structure anatomique du rhizome. — L'observation des coupes effectuées au niveau des six premiers entre-nœuds comptés à partir de l'apex montre que l'arc xylémien est complètement formé à la fin du deuxième entre-nœud : la différenciation des trachéides a donc lieu à un niveau plus proche de l'apex que chez les témoins.

— Au niveau du quatrième entre-nœud, le diamètre du rhizome et de sa stèle est diminué (72 et 66 p. 100 respectivement des valeurs témoins). On constate, en outre, la réduction des lacunes de l'aérenchyme, l'hypertrophie des éléments endodermiques, la faible vascularisation de la stèle (non accompagnée de troubles de la lignification) et, enfin, la diminution du nombre et de la taille des cellules médullaires, plus accentuée au niveau des feuilles spatulées (fig. 42, *b*) qu'au niveau des feuilles bifides (fig. 42 *a*). Cependant aucune des coupes observées n'a montré la disparition totale de la moelle.

EN RÉSUMÉ, l'ensemble de ces données confirme le rôle essentiel généralement attribué au soufre et son absolue nécessité pour le développement normal du *Marsilea*. Bien que son absence ne provoque pas de troubles aussi rapides que certaines autres carences, il n'en est pas moins évident que les lésions qui apparaissent à plus ou moins longue échéance traduisent

des perturbations profondes : nous pensons en particulier à la formation de feuilles juvéniles et, du point de vue histologique, à la réduction importante des constituants stéliques : parmi ceux-ci, la moelle est particulièrement affectée.

B. — ACTION DES IONS SULFURIQUES.

Les variations de la concentration en ions SO_4^- ont été provoquées par des additions convenables de sulfate de sodium au milieu dépourvu de soufre ou au milieu témoin.

Les milieux, *grosso modo*, comporteront donc deux ions sodium pour un ion sulfurique.

L'examen des résultats devra donc être particulièrement scrupuleux, de manière à ne pas attribuer aux ions sulfuriques l'action propre des ions sodium.

1^o Aspect morphologique. — Dès le premier passage apparaissent les modifications qui, par la suite, auront une légère tendance à s'accroître mais resteront du même type.

— Aux concentrations inférieures à celle du milieu témoin (0,51 mI) s'observent les plus belles cultures : leurs longues ra-

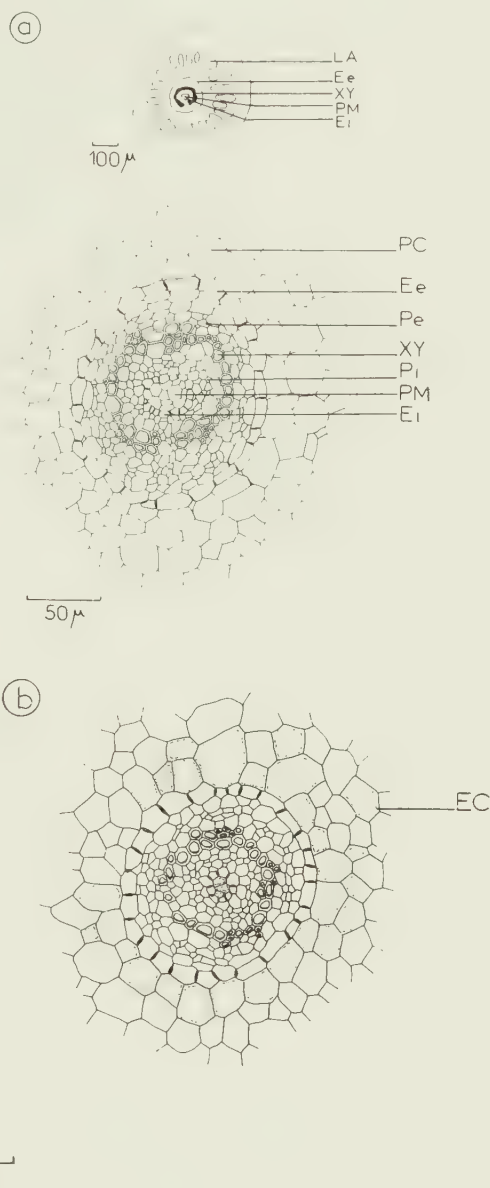


FIG. 42. — Structure anatomique du rhizome d'un sporophyte de *M. d.* carencé en soufre (culture de 4^e passage).

a : au niveau du 3^e entre-nœud, entre 2 feuilles bifides. — *b* : au niveau du 5^e entre-nœud entre 2 feuilles spatulées.

On notera la réduction de la moelle, ainsi que l'hypertrophie des cellules de l'endoderme externe.

LA, lacune aërifère de l'aérenchyme ; PC et PM, parenchymes cortical et médullaire ; Ee et Ei, endodermes externe et interne ; Pe et Pi, phloèmes externe et interne ; XY, xylème ; EC, épaississement cellulosique.

cines sont blanches et souples. Leur rhizome est plus étiré. Leurs pétioles portent de larges folioles. La pigmentation est normale. Cet aspect caractérise, à la fin du quatrième passage, les cultures pourvues de 0,25 mI, la plus faible concentration se révélant à la longue un peu insuffisante à assurer un développement aussi satisfaisant.

La concentration du milieu témoin se manifeste rapidement comme étant la limite supérieure à ne pas dépasser. En effet, de 0,75 à 8 mI, les sporophytes, quoique de physionomie normale, sont plus grêles, le rhizome et les pétioles ont tendance à se raccourcir, les folioles à devenir plus petites. Toutefois leur pigmentation est plus intense.

— Au-delà de 8 mI, les cultures petites, à feuilles palmées ou en crosse, sont caractérisées par des racines noires, ondulées, cassantes, et par la coloration vert noirâtre de leurs organes chlorophylliens. La figure 43 représente un tel sporophyte cultivé pendant quatre passages consécutifs sur le milieu le plus riche en sulfates.



FIG. 43. — Aspect morphologique d'un sporophyte de *M. d.* cultivé pendant 4 passages consécutifs sur un milieu très riche en ions sulfuriques (60 mI/l) ($\times 2$).

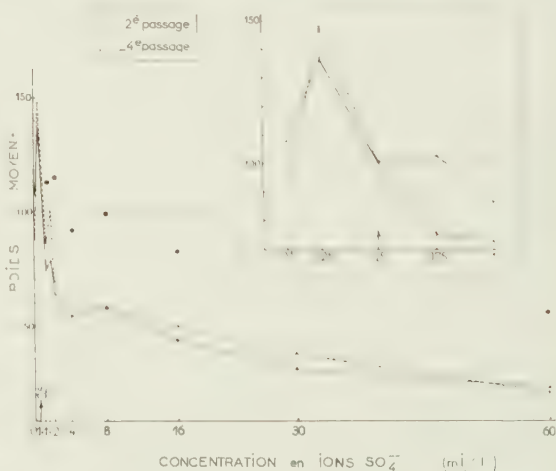
Dans ce cas encore, le système foliaire est fortement sous-développé : il ne comprend pas de feuilles épanouies.

2° Données quantitatives. — a. *Accroissement pondéral.* — Les courbes de la figure 44 indiquent, plus nettement que nos descriptions précédentes,

FIG. 44. — Influence des ions sulfuriques sur l'accroissement pondéral des sporophytes de *M. d.*

En ordonnée, le poids moyen est exprimé en pour-cent du poids des sporophytes témoins. Ce poids est égal à 590 mg à la fin du 2^e passage et à 349 mg à la fin du 4^e passage.

Sur la figure, les points correspondent aux poids de sporophytes cultivés en présence de doses équivalentes d'ions Na



l'action des ions sulfuriques : la chute de croissance est provoquée par des concentrations relativement faibles. Ainsi, l'addition d'un quart ou d'un demi-ion excédant la concentration de référence suffit à la diminuer de 25 p. 100. Il est clair que les ions sulfuriques, de tous ceux déjà étudiés, sont les plus toxiques.

Cette action est bien due à l'intolérance du *Marsilea* aux sulfates et non à la présence des ions sodium : on peut s'en assurer, sur la figure 44, en comparant la chute de poids beaucoup plus faible que ces derniers provoquent.

L'optimum de concentration se situe très nettement à 0,25 mI.

b. *Autres variables.* — L'examen des courbes de la figure 45 indique que :

— A la concentration optimale, les sulfates exaltent l'élongation des organes alors qu'ils laissent indifférente leur formation.

— Aux concentrations plus fortes, l'initiation des organes portés par le rhizome est progressivement freinée. Il est intéressant de noter que, parmi

tous les ions étudiés dans ce travail, ce sont les sulfates fournis en excès qui inhibent le plus fortement le pouvoir organogène de l'apex.

L'élongation est, elle aussi, fortement diminuée, le rhizome étant l'organe qui souffre le plus rapidement de l'apport de sulfates.

La comparaison de ces données avec celles fournies par l'étude du chlorure de sodium est facilitée par l'examen du tableau XXIV. Elle appelle les remarques suivantes :

— A l'actif des ions sulfuriques peut être attribué, en toute sûreté, le raccourcissement du rhizome et des racines.

— Leur toxicité, en ce qui concerne l'élongation pétioleaire, est plus discutable, car l'action des ions Na^+ peut s'ajouter à celle des ions SO_4^{--} . On remarquera cependant que, à toutes les concentrations, les

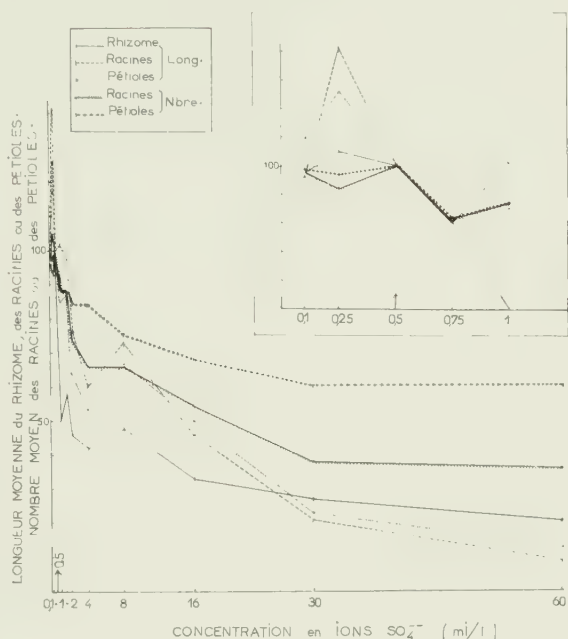


FIG. 45. — Variations, en fonction de la concentration en ions sulfuriques, des divers caractères quantitatifs des sporophytes de 4^e passage.

En ordonnée, les valeurs de ces caractères sont exprimées en pour-cent des valeurs données par les témoins. Ces valeurs sont : longueur moyenne du rhizome, 23,7 mm ; longueur moyenne des racines, 698 mm ; longueur moyenne des pétioles, 481 mm ; nombre moyen des racines, 21,4 ; nombre moyen des pétioles, 7,7.

ions sodiques la freinent moins fortement que les ions sulfuriques.

— Le nombre des organes dépend peu de la concentration en sulfates. Les feuilles n'y sont, en particulier, pas plus sensibles qu'à l'ion accompagnateur. A la plus forte dose, cependant, l'action des ions sodiques est très nettement moins forte que celle des anions.

Ces remarques n'infirment pas les conclusions que nous donnions précédemment quant à la grande toxicité des sulfates rapidement mal tolérés lorsque les milieux s'en enrichissent : elles limitent à certains des caractères quantitatifs étudiés l'action qui leur revient en propre et la distinguent de celle qui est provoquée par les ions accompagnateurs ajoutés obligatoirement à des concentrations doubles.

A l'appui de cette conclusion, on notera que les valeurs numériques

TABLEAU XXIV. — ACTION COMPARÉE DES IONS SULFURIQUES ET DES IONS SODIQUES SUR LES DIVERS CARACTÈRES QUANTITATIFS DU SPOROPHYTE DU *Marsilea*.

CARACTÈRES QUANTITATIFS.	CONCENTRATIONS EN mI SO_4^{--} .					
	1	2	4	8	16	60
	Concentrations en mI Na^+ .					
	(1)	(3)	(7)	(15)	(31)	(119)
Longueur moyenne du rhizome...	50 <i>122</i>	46 <i>117</i>	42 <i>97</i>	48 <i>95</i>	33 <i>84</i>	26 <i>60</i>
Longueur moyenne des pétioles .	85 <i>95</i>	64 <i>102</i>	55 <i>91</i>	67 <i>92</i>	50 <i>69</i>	13 <i>27</i>
Longueur moyenne des racines ..	102 <i>139</i>	76 <i>140</i>	60 <i>105</i>	73 <i>121</i>	45 <i>98</i>	9 <i>49</i>
Nombre moyen des pétioles	88 <i>93</i>	84 <i>93</i>	84 <i>76</i>	75 <i>81</i>	68 <i>67</i>	60 <i>72</i>
Nombre moyen des racines	88 <i>101</i>	74 <i>84</i>	66 <i>74</i>	68 <i>75</i>	55 <i>65</i>	36 <i>61</i>

Les valeurs de ces différentes variables sont exprimées en pour-cent de la valeur témoin.

En romain : action des ions SO_4 .

En italique : action de « 2 Na »

Les chiffres gras sont ceux qui indiquent que l'action des ions SO_4 est significativement différente de celle des ions « 2 Na »

les plus faibles groupées dans le tableau XXIV correspondent toujours à celles fournies par les sulfates et non par les ions sodiques : les différences mesurées, même lorsqu'elles sont peu marquées, traduisent, dans tous les cas, l'action plus défavorable des premiers.

Le dénombrement des feuilles épanouies conduit aux mêmes conclusions (tableau XXV).

— A la plus faible concentration, elles sont plus nombreuses, ce qui peut contribuer à expliquer que les cultures pèsent un peu plus lourd que les témoins bien que leurs autres variables soient peu différentes.

TABLEAU XXV. — INFLUENCE DES IONS SULFURIQUES SUR LA FORMATION DES FEUILLES ÉPANOUIES. LES VALEURS NUMÉRIQUES SONT EXPRIMÉES EN POUR-CENT DE LA VALEUR TÉMOIN.

Le chiffre en italique indique l'action des ions « 2 Na ».

CONCENTRATIONS EN $\text{mI SO}_4^{--}/\text{L.}$											
0,1	0,25	0,51	0,75	1	1,5	2	4	8	16	30	60
127	180	100	99	120	107	50	33	40	0	0	0
				85		120	75	70	60		0

— A l'optimum, leur formation est considérablement exaltée. Mais, au delà de 1,5 mI, elle est retardée et complètement bloquée au-dessus de 8 mI.

3^o Structure anatomique du rhizome. — Les observations précédentes, montrant la grande sensibilité du *Marsilea* aux ions sulfuriques, nous ont conduite à étudier systématiquement la structure du rhizome à toutes les concentrations expérimentées.

Les mensurations du rhizome et de sa stèle (tableau XXVI) indiquent

TABLEAU XXVI. — INFLUENCE DES IONS SULFURIQUES SUR LE DIAMÈTRE DU RHIZOME ET DE SA STÈLE.

DIAMÈTRES (exprimés en des valeurs témoins).	CONCENTRATIONS EN IONS SO_4^{--} (exprimées en mI/l).											
	0,1	0,25	0,51	0,75	1	1,5	2	4	8	16	30	60
Rhizome	100	100	100	100	91	93	98	91	87	85	91	91
Stèle	98	100	100	94	81	88	84	81	81	81	81	75

que le diamètre de la stèle est plus réduit que celui du rhizome pris dans son ensemble.

Conjointement à cette réduction, aucune anomalie n'est observée. Même à la plus forte dose, *la structure anatomique reste normale*. Notons seulement que les trachéïdes sont de plus petit calibre et que le parenchyme qui les environne comprend des cellules moins grandes.

Cette absence de modifications importantes ne doit pas nous étonner outre mesure. L'expérience a montré, en effet, qu'une structure anatomique aberrante n'est pas toujours liée à une croissance défectueuse, mais à la présence de modifications morphologiques typiques concernant plus spécialement les feuilles. Ainsi, l'apparition de feuilles du type juvénile est concomitante d'une structure stélisque moins complexe.

Qu'il nous suffise pour le moment de signaler ce point. Nous verrons plus tard, à la lumière d'autres résultats, comment l'interpréter.

EN RÉSUMÉ, le *Marsilea* a un besoin absolu de soufre pour effectuer sa croissance. Sans lui, le développement de la plante et, plus spécialement, de ses feuilles ne peut s'effectuer normalement : en cas de carence prolongée, les nouvelles feuilles apparues sur le rhizome sont du type juvénile. Conjointement, la structure anatomique du rhizome est anormale : la stèle, qui demeure amphiphloïque, ne comporte plus qu'une moelle très réduite.

Cependant, le *Marsilea* n'a que de faibles besoins de soufre (sous forme de sulfates) pour croître. C'est qu'il est particulièrement sensible à la toxicité des ions sulfuriques, toxicité qui se traduit plus par des troubles de la morphologie et de la croissance que par des manifestations anatomiques.

6° Les ions phosphoriques.

A. — INFLUENCE DE LA CARENCE EN PHOSPHORE.

La suppression des phosphates (remplacés par les chlorures équivalents) entraîne des lésions rapides des tissus.

— Les organes sont peu développés (fig. 46). Les feuilles sont intensément colorées en vert foncé. Les nécroses des racines sont importantes. Si la carence est prolongée, la culture devient complètement noire; seul l'apex reste chlorophyllien.

À la fin du quatrième passage, 50 p. 100 des explantats survivent. Le rhizome dominant est rudimentaire.

Les feuilles, peu nombreuses, restent à l'état d'ébauches. L'observation sous la loupe permet de préciser qu'elles sont quadrifides.

Les racines sont, relativement à la taille des feuilles, très développées. Nous avons déjà noté, lors de la carence en azote, une telle disproportion entre le développement des racines et celui des feuilles. Cette simi-

litude peut s'expliquer lorsque l'on sait que l'absence de phosphore entraîne l'inutilisation de l'azote (présent ici sous forme de nitrates), même lorsque ce dernier est abondamment disponible. Il est légitime de penser que le *Marsilea* se comporte, de ce point de vue, comme la Tomate expérimentée par ECKERSON [71].

Les sporophytes ne survivent pas au-delà du quatrième passage.

Structure anatomique du rhizome. — La carence en phosphore produit de faibles modifications anatomiques.

Le diamètre du rhizome est diminué d'environ 30 p. 100, mais le rapport stèle/rhizome n'est pas modifié. La réduction de la taille est due à une diminution du nombre des cellules. Seules, les trachéides, en nombre égal, sont plus petites que chez les témoins.

La différenciation du système conducteur, plus précoce, est terminée au deuxième entre-nœud.



FIG. 46. — Aspect morphologique d'un sporophyte de *M. d.* cultivé sur un milieu dépourvu de phosphore pendant 4 passages consécutifs ($\times 2$).

Noter, près de l'apex principal, la présence de feuilles restées à l'état d'ébauches.

Ex, explantat ; BT, bourgeon terminal ; Fe, feuille restée à l'état d'ébauche.

B. — ACTION DES IONS PHOSPHORIQUES.

Les concentrations étudiées sont échelonnées entre 0,5 et 60 mI/litre. Rappelons que le milieu témoin contient 0,9 mI PO_4H_2^- .

1^o Aspect morphologique. — A la plus faible concentration, la physiologie des sporophytes est normale.

— Les plus belles cultures s'observent sur des milieux plus riches (2,4 et même 8 ml).

— Au delà, le rhizome, peu étiré, porte des feuilles dépourvues de larges folioles déployées. Palmées ou enroulées en crosse, elles sont anormalement pigmentées en vert jaunâtre, le jaune devenant progressivement dominant avec l'apport de phosphates (1).

— Les racines, plus ocrées que celles des témoins, excrètent dans le milieu nutritif des produits qui le colorent en jaune.

(1) REDISKE et BIDDULPH [157] ont montré que les phosphates, s'ils sont en excès, modifient défavorablement le métabolisme des métaux et occasionnent des chloroses dues à leur utilisation anormale.

— A 60 ml, huit explantats sur douze sont morts. Les survivants poussent mal. Les sporophytes qui en dérivent sont jaunes. Les feuilles, toutes « en crosse », sont petites. Les racines, très granuleuses et cassantes, sont complètement nécrosées.

2° Données quantitatives. — a. *Accroissement pondéral.* — Les poids des sporophytes de deuxième et de quatrième passage sont groupés dans la figure 47.

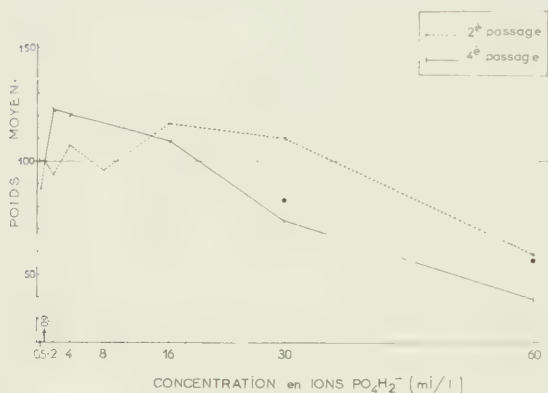


FIG. 47. — Influence des ions phosphoriques sur l'accroissement pondéral des sporophytes de *M. d.*

En ordonnée, la valeur du poids moyen est exprimée en pour-cent de la valeur témoin égale à 667 mg à la fin du 2^e passage et à 323 mg à la fin du 4^e passage.

Sur la figure, les points correspondent aux poids de sporophytes cultivés en présence de doses équivalentes d'ions Na^+ .

De son examen, on peut déduire que les ions phosphoriques doivent s'accumuler dans la plante, car l'optimum de concentration se déplace vers de plus faibles valeurs au cours des passages étudiés. Au quatrième, il est situé entre 2 et 8 ml. L'aspect morphologique décrit ci-dessus nous conduit à l'estimer à 2 ou 4 ml/litre. Les doses de 30 et 60 ml sont nettement toxiques.

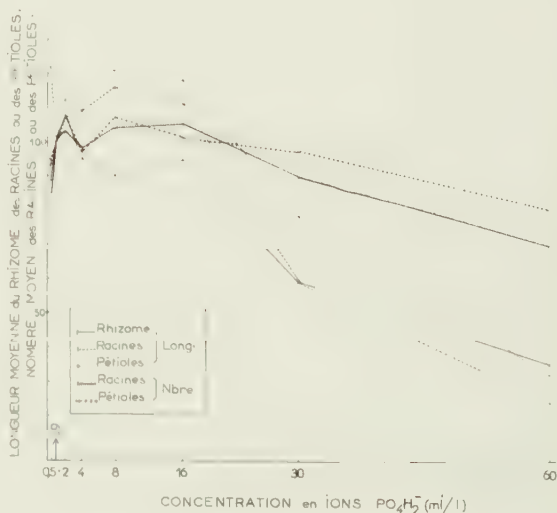
b. *Autres variables.* —

Les données numériques ayant trait aux autres

caractères quantitatifs sont groupées dans la figure 48. Toutes les variables

FIG. 48. — Variations, en fonction de la concentration en ions phosphoriques, des divers caractères quantitatifs des sporophytes de 4^e passage.

En ordonnée, les valeurs de ces caractères sont exprimées en pour-cent des valeurs données par les témoins. Ces valeurs sont : longueur moyenne du rhizome, 37 mm ; longueur moyenne des racines, 763 mm ; longueur moyenne des pétioles, 468 mm ; nombre moyen des racines, 21,8 ; nombre moyen des pétioles, 7,5.



suivent *grosso modo* la courbe représentative du poids frais. Remarquons que les concentrations qui occasionnent la chlorose (8 et 16 mI) exaltent encore, quoique faiblement, l'élongation pétioilaire et radiculaire. Les ions phosphoriques ne modifient pas, dans de très larges limites, le nombre des organes formés en quarante-cinq jours.

A l'optimum de concentration, les feuilles épanouies sont très nettement plus nombreuses (tableau XXVII).

TABLEAU XXVII. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN IONS PHOSPHORIQUES SUR LE NOMBRE DES FEUILLES A FOLIOLES ÉPANOUIES. LES VALEURS NUMÉRIQUES SONT EXPRIMÉES EN POUR-CENT DE LA VALEUR TÉMOIN.

CONCENTRATIONS EN mI PO_4H_2 /l.							
0,5	0,92	2	4	8	16	30	60
100	100	170	210	180	100	0	0

A 30 et 60 mI, l'arrêt de leur formation est dû en partie aux phosphates et, pour une autre partie, aux ions sodium.

3° *Structure anatomique du rhizome.* — A toutes les concentrations expérimentées, les variations de la taille du rhizome et de sa stèle sont infimes (tableau XXVIII). De même que la structure, la différenciation

TABLEAU XXVIII. — INFLUENCE DES IONS PHOSPHORIQUES SUR LA TAILLE DU RHIZOME ET DE SA STÈLE.

DIAMÈTRES (exprimés en % des valeurs témoins).	CONCENTRATIONS EN IONS PO_4H_2^- (exprimées en mI/l).							
	0,5	0,92	2	4	8	16	30	60
Rhizome	100	100	100	97	91	102	98	95
Stèle.....	91	100	100	93	90	97	93	97

des trachéides est normale. A la concentration de 60 mI, à peine note-t-on une légère diminution du calibre des éléments conducteurs.

EN RÉSUMÉ, les anomalies de la morphologie et de la croissance provoquées par la carence montrent que le phosphore est indispensable au sporophyte de *M. d.* En son absence, en effet, il est, avant de mourir,

anormal : tous ses organes sont peu développés. Les feuilles, particulièrement lésées, restent à l'état d'ébauches. Ces modifications n'entraînent pas de changements de structure notables de l'anatomie du rhizome observé au niveau du quatrième entre-nœud ; cependant, il faut noter que la différenciation et la lignification des trachéides sont totales à un niveau plus proche de l'apex que lorsque les conditions sont normales.

Par contre, les phosphates sont peu toxiques. Les altérations qu'occasionne leur utilisation excessive se manifestent plus par la chlorose des organes verts que par une chute de croissance. La structure anatomique du rhizome se révèle alors particulièrement stable. L'optimum est situé à 2-4 mI/litre, soit une concentration deux à quatre fois supérieure à celle du milieu témoin.

7° Résumé général.

Au terme de ce deuxième chapitre, il n'est pas inutile de résumer les principaux résultats obtenus et de tenter d'établir les rapports ou les différences qui caractérisent les réactions du *Marsilea* vis-à-vis des macro-éléments étudiés.

Le tableau XXIX et la figure 49 récapitulent les plus importantes de nos observations. On remarquera que :

A. QUEL QUE SOIT L'ION SUPPRIMÉ TOTALEMENT, le sporophyte de *Marsilea* présente les modifications générales suivantes :

1° Une diminution de croissance importante, accompagnée de nécroses des divers organes traduisant une sénescence prématurée ;

2° Un sous-développement des feuilles qui sont soit du type dit adulte, c'est-à-dire quadrifides, mais restent alors palmées ou enroulées en crosse ou à l'état d'ébauches, soit du type dit juvénile (parce qu'il n'existe normalement que chez la jeune plantule issue de l'œuf), c'est-à-dire uni- ou bifoliolées ;

3° Un raccourcissement du rhizome et des racines ;

4° La réduction du diamètre du rhizome et de sa stèle, qui comporte des trachéides peu nombreuses et de petit calibre, mais qui se différencient plus précocement ;

5° La mort plus ou moins rapide des explantats et des plants qui en dérivent. (Totale au bout de vingt-cinq jours lorsque l'azote fait défaut, elle n'est que partielle au bout de sept mois en cas de carence en potassium.)

A côté de ces modifications communes à toutes les carences, certaines anomalies sont nettement caractéristiques de l'absence d'un ion particulier :

1° Les ions Ca^{++} , Mg^{++} , SO_4^{--} , lorsqu'ils sont éliminés du milieu nutritif, entraînent une simplification de l'anatomie du rhizome qui est peu vascularisé et ne présente plus qu'un nombre très réduit de cellules

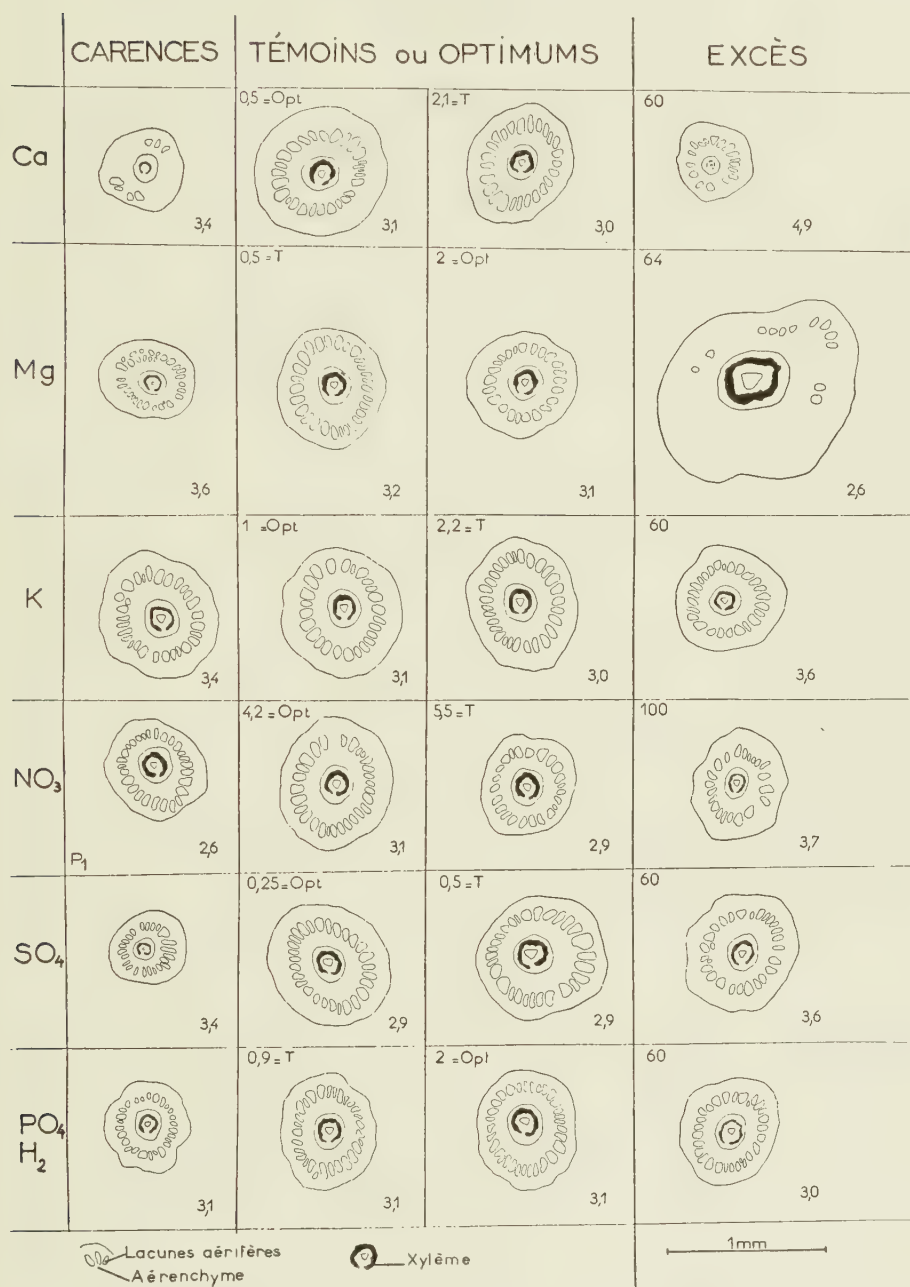


FIG. 49. — Schémas représentant les modifications anatomiques du rhizome de *M. d.* sous l'influence de la nutrition minérale.

Dans chaque case, le nombre supérieur (coin gauche) représente la concentration de l'ion considéré, en mI/l. Le nombre inférieur (coin droit) donne la valeur du rhizome/stèle.

T, milieu témoin ; Opt, milieu optimum.

TABLEAU XXIX. — RÉCAPITULATION DES PRINCIPAUX RÉSULTATS PRÉSENTÉS AU COURS DU CHAPITRE III.

CRITÈRES.	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	K ⁺	NO ₃ ⁻	SO ₄ ⁻	PO ₄ H ₂ ⁻
CAS DE CARENCE. Morphologie.	Feuilles juvéniles. Nécroses affectant en dernier l'apex principal. Chloroses. Ramification du rhizome.	Feuilles juvéniles. Nécroses affectant en dernier l'apex principal. Chloroses.	Feuilles palmées ou en crosse. Pas de feuilles épanouies. Nécroses éparpillant l'apex. Chloroses.	Feuilles à l'état d'ébauches (quadrifides). Nécroses.	Feuilles juvéniles. Nécroses. Chloroses.	Feuilles à l'état d'ébauches (quadrifides). Nécroses.
Mort.	3 ^e ou 4 ^e passage.	2 ^e passage.	Partielle au 5 ^e passage.	1 ^{er} passage.	4 ^e passage.	4 ^e passage.
Anatomie.	Protestole médullée. Hypertrophie de l'endoderme. Tra-chéides peu nombreuses et petites.	Moelle réduite à une seule cellule. Hypertrophie de l'endoderme. Tra-chéides peu nombreuses et petites.	Modifications peu notables.	Hypertrophie de l'endoderme. Vascularisation intense.	Moelle très réduite. Hypertrophie de l'endoderme. Tra-chéides peu nombreuses et petites.	Modifications peu notables.
CONCENTRATION OPTIMALE.	0,5 ml/l	2 ml/l	1 ml/l	4,2 ml/l	0,25 ml/l	2 à 4 ml/l

Croissance par rapport aux témoins. (Concentration du milieu témoin.)	164 % (2,12 ml)	150 % (0,51 ml)	120 % (2,16 ml)	138 % (5,5 ml)	148 % (0,51 ml)	123 % (0,92 ml)
	15 ml/l	30 ml/l	30 ml/l	10 ml/l	1 ml/l	30 ml/l
CAS D'UN EXCÈS. Nette toxicité à partir de :						
Morphologie (à la plus forte concentration expérimentée).	Feuilles juvéniles. Nécroses. Grossissement des bourgeons latéraux.	Feuilles épa-nouies. Pigmentation normale.	Très rares feuilles quadrifides épa-nouies. Feuilles palmées. Nécroses.	Pas de feuilles quadrifides épa-nouies. Feuilles en crosse (4 folioles). Nécroses.	Pas de feuilles quadrifides épa-nouies. Feuilles palmées ou en crosse (4 folioles). Nécroses.	Pas de feuilles quadrifides épa-nouies. Feuilles en crosse (4 folioles). Nécroses.
Mortalité au 4 ^e passage (à la plus forte concentration expérimentée).	Totale.	Faible.	Nulle.	Nulle.	Nulle.	Nulle.
Anatomie.	Moelle réduite à une cellule. Troubles de la lignification.	Hypertrophie du rhizome. Intense vascularisation.	Modifications peu notables.	Modifications peu notables.	Modifications peu notables.	Modifications peu notables.

médullaires. Cette réduction de la moelle s'observe toujours sur des rhizomes qui portent des feuilles « juvéniles », spatulées ou bifides.

2° L'absence de l'ion NO_3^- provoque, au contraire, une production intense des trachéides.

3° Une assise, l'endoderme, est particulièrement sensible à la carence en ces quatre derniers macro-éléments : il réagit en s'hypertrophiant.

4° La carence totale en calcium a permis d'obtenir les résultats les plus intéressants : on constate non seulement une simplification anatomique du rhizome (qui, de la forme solénostèle amphiphloïque, redevient protostèle médullée, plus primitive), mais encore une profonde perturbation dans l'organogenèse de la plante par suppression de la dominance apicale. Tous les bourgeons latéraux de la plante, qui sont à l'état latent sur milieu complet, se développent, d'où la formation de cultures ramifiées tout à fait caractéristiques. Nous verrons plus loin que ce buissonnement du sporophyte peut avoir d'autres causes que la carence en calcium. Nous le retrouverons, en effet, provoqué par des déséquilibres cationiques.

B. A DES DEGRÉS DIFFÉRENTS, LA TOXICITÉ D'UN ÉLÉMENT se traduit par :

1° Une chute de croissance ;

2° La diminution du nombre ou l'absence totale des feuilles épanouies. (La formation de feuilles du type juvénile est provoquée uniquement par l'excès de calcium) ;

3° L'absence de modifications anatomiques notables. En particulier, la moelle est toujours bien développée.

Le calcium, à dose trop forte, est seul à faire exception. Dans ce cas, comme dans celui des carences, on peut observer à nouveau que la présence de feuilles rudimentaires uni- ou bifides se traduit, anatomiquement, par la réduction de la moelle à une seule cellule (entre autres modifications).

CHAPITRE IV

EFFETS DES VARIATIONS SIMULTANÉES DE LA CONCENTRATION EN MACRO-ÉLÉMENTS

Il était indispensable de compléter l'étude faite précédemment par celle des effets produits lorsque l'on modifie *simultanément* la concentration des différents ions du milieu témoin. Le champ d'observation a été délibérément restreint à une cinquantaine de milieux.

— Dans une première série d'essais, les sporophytes de *M. d.* ont été cultivés sur des solutions nutritives pourvues de différentes concentrations en *cations*. Des données obtenues, il est ressorti une combinaison cationique « améliorée ».

— Ensuite, suivant le même procédé, les observations faites lorsque varie la teneur en *anions* ont abouti à la proposition d'une combinaison anionique « améliorée ».

— Enfin, les résultats d'expériences réalisées dans le domaine étroit des concentrations voisines des optimums ainsi déterminés ont conduit à l'établissement d'une formule de solution minérale permettant la croissance maximale du *Marsilea*.

Les concentrations des différents ions ont été choisies sur la base des résultats fournis par le chapitre III. Pour chacun des macro-éléments entrant dans la composition du milieu de référence, trois concentrations ont été expérimentées, l'une correspondant à l'optimum, une plus faible et une plus forte que celui-ci. Ainsi, pour les cations comme pour les anions, $3 \times 3 \times 3 = 27$ milieux différents ont été composés.

Dans l'exposé qui va suivre, il a paru commode d'appeler « *opt* », « *hypo* », « *hyper* » les différentes concentrations, ce qui évitera l'usage monotone des chiffres équivalents. Qu'il suffise de signaler que les teneurs « *hypo* » et « *hyper* » d'un ion considéré correspondent à celles qui ont provoqué une forte chute de croissance par rapport à l'optimum déterminé lorsque cet ion variait isolément des autres.

1° Effets des variations simultanées de la concentration en cations.

A. — RÉSULTATS GÉNÉRAUX.

Le tableau XXX indique les valeurs des différentes concentrations choisies pour chaque cation, la composition anionique étant celle du milieu témoin.

TABLEAU XXX. — VALEURS DES CONCENTRATIONS EN CHACUN DES CATIONS AYANT SERVI À COMPOSER LES DIFFÉRENTS MILIEUX NUTRITIFS.

CONCENTRATIONS (exprimées en mI/l).	NATURE DU CATION.		
	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	K ⁺
« Hypo »	0,125	0,1	0,25
« Opt »	0,5	2	1
« Hyper ».....	10	30	20

L'expérience a comporté trois passages de quarante-cinq jours chacun. Les accroissements pondéraux (exprimés en pour-cent de la valeur témoin) des sporophytes de troisième passage sont groupés dans le tableau XXXI. De l'examen des données numériques, il ressort que :

1° Il existe un fort antagonisme entre le calcium et le magnésium. — La toxicité des ions magnésium est atténuée par une forte dose d'ions calcium.

En effet, tous les milieux à « Ca hypo ou opt » trop riches par ailleurs en magnésium (« Mg hyper ») provoquent la mort rapide des sporophytes : ils ne survivent pas au-delà du deuxième passage. *Avant de mourir, ils présentent des modifications morphologiques et anatomiques frappantes* qui seront étudiées en détail plus loin : elles se traduisent par la ramification anormale du rhizome.

À l'opposé, en présence d'une forte concentration en ions Ca⁺⁺ (« Ca hyper »), la croissance est la même quel que soit l'apport en magnésium : elle est uniformément diminuée d'au moins 40 p. 100. Autrement dit, le calcium est rapidement toxique par lui-même (milieux à « Mg hypo ou opt »), toxicité que nous avons déjà mise en évidence (cf. p. 226 et suivantes), mais agit comme un antitoxique vis-à-vis du magnésium (milieux à « Mg hyper ») : tous les sporophytes sont vivants et d'un aspect presque normal.

Deux conclusions s'imposent dès maintenant :

— *Un milieu pourvu de faibles doses de calcium doit contenir peu de magnésium.*

— *La toxicité du magnésium peut être atténuée par un apport suffisant de calcium, mais en ce cas apparaît la toxicité propre à ce dernier.*

2° On observe un léger antagonisme K — Mg⁺⁺ : un milieu trop riche en magnésium et trop pauvre en calcium est moins rapidement nocif s'il est abondamment pourvu de potassium.

TABLEAU XXXI. — INFLUENCE DE DIFFÉRENTES COMBINAISONS CATIONIQUES SUR L'AGGROISSEMENT PONDÉRAL DES SPOROPHYTES DE TROISIÈME PASSAGE. (LE POIDS FINAL MOYEN EST EXPRIMÉ EN POUR-CENT DE LA VALEUR TÉMOIN.)

K^+			K^+			K^+					
hyper	62	74	$\times \times$	hyper	94	73	40	hyper	47	55	55
opt	95	85	$\times$	opt	132	121	$\times \times$	opt	63	61	49
hypo	121	87	$\times$	hypo	122	112	$\times \times$	hypo	59	60	45
			hyper Mg^{++}	hypo	opt	hyper Mg^{++}					
			hypo	opt	hyper	hyper Mg^{++}					
						Ca^{++} hypo : 0,125	Ca^{++} hyper : 10				

Le signe $\times$ indique que les explantats sont morts au cours du premier passage, sans avoir repris. Le signe $\times \times$ indique que les sporophytes sont morts au cours du deuxième passage.

Examinons les points du tableau XXXI correspondant à la concentration « hyper » en magnésium :

a. Sur les solutions les plus pauvres en calcium, les cultures meurent dès le premier passage si l'apport en potassium est faible. Dans le cas contraire, la mort ne survient qu'au deuxième.

b. Sur les milieux à Ca « opt », l'action du potassium est similaire. Un excès permet aux plants de vivre au-delà du troisième passage, alors que le milieu qui n'en contient que la dose « hypo » ou « opt » empêche leur survie au delà du deuxième.

Ainsi, le potassium permet une résistance plus grande des cultures pourvues de trop petites quantités de calcium et les protège contre le magnésium dont il contrebalance la toxicité. Par contre, son action, si elle existe, est masquée dans le cas de solutions nutritives riches en calcium.

3° *L'interaction entre le calcium et le potassium n'est pas aussi nette.* — On remarque, cependant, aux faibles concentrations en calcium (« Ca hypo ou opt »), un léger antagonisme : on ne peut ajouter à ces milieux un excès de potassium sans qu'il en résulte une diminution de croissance. Sur les milieux plus riches en calcium (« Ca hyper »), la relation est masquée par l'action trop intense des ions Ca^{++} .

L'analyse de variance à laquelle nous avons fait appel a confirmé ces conclusions. Les résultats en sont groupés dans le tableau XXXII.

TABLEAU XXXII. — DÉTERMINATION DES INTERACTIONS ENTRE CATIONS PAR ANALYSE DE VARIANCE.

F (calculé).	F (tables)	
	au seuil 0,05	au seuil 0,01
$F_{\text{Ca}} = 22,64$	3,12	5
$F_{\text{K}} = 0,44$	3,12	5
$F_{\text{Mg}} = 332,19$	3,12	5
$F_{\text{Ca/Mg}} = 63,13$	2,5	3,6
$F_{\text{K/Mg}} = 9,8$	2,5	3,6
$F_{\text{K/Ca}} = 6,93$	2,5	3,6

Il existe bien une très forte interaction Ca Mg et une interaction K/Mg et K/Ca beaucoup plus faible.

L'analyse montre, en outre, que la relation entre le potassium et le magnésium est plus marquée qu'entre le potassium et le calcium.

4° *Il se dégage de cette étude quatre combinaisons cationiques* permettant une croissance supérieure d'au moins 20 p. 100 à celle obtenue sur le milieu témoin. Ce sont celles pourvues de :

$$\begin{aligned} & \text{« Ca}^{++} \text{ hypo/Mg}^{++} \text{ hypo/K}^{+} \text{ hypo »} \\ & \text{« Ca}^{++} \text{ opt /Mg}^{++} \text{ hypo/K}^{+} \text{ hypo »} \\ & \text{« Ca}^{++} \text{ opt /Mg}^{++} \text{ hypo/K}^{+} \text{ opt »} \\ & \text{« Ca}^{++} \text{ opt /Mg}^{++} \text{ opt /K}^{+} \text{ opt »} \end{aligned}$$

Il n'est pas utile de présenter les résultats numériques des autres caractères quantitatifs. Ils donnent en effet des renseignements qu'il était aisé de prévoir : *une faible croissance est caractérisée par la nette diminution du nombre des feuilles épanouies* (leur absence est générale sur les milieux à « Ca hyper »), par un moindre allongement des feuilles et des racines, par la présence de nécroses. Cependant, ils permettront d'éliminer, parmi les combinaisons cationiques améliorées, celle qui contient la quantité « hypo » des trois ions : l'absence totale de feuilles à larges folioles déployées indique que l'augmentation du poids frais ne reflète pas un état physiologique meilleur de la Fougère. La présence d'un important système racinaire, due peut-être à l'action des ions accompagnateurs (p. 207 et 209), en est sans doute la cause.

Dans tous les cas où la croissance est exaltée, il convient de remarquer que *la concentration en calcium est optimale, et que le rapport Ca/Mg de ces solutions améliorées est très variable puisqu'il est égal dans un cas à 0,25 et dans les deux autres à 5*, soit une différence relative de vingt fois. Une telle observation permet donc de mettre en lumière un fait assez inattendu : l'insensibilité du *Marsilea* vis-à-vis de ce rapport lorsque les concentrations en ions bivalents sont faibles ou moyennes (1). Notons enfin que la concentration optimale en magnésium, lorsque s'exercent les phénomènes d'interactions, peut être plus faible que celle déterminée au cours de l'étude de l'ion considéré isolément.

B. — ÉTUDE DES SPOROPHYTES RAMIFIÉS.

Nous avons vu que, sur les solutions trop riches en magnésium et trop pauvres en calcium, les sporophytes ne survivent pas au-delà du premier ou du deuxième passage.

— Les explantats cultivés sur les milieux à « Ca hypo/Mg hyper » pourvus de concentrations faibles ou optimales en potassium meurent quelques jours après leur premier repiquage. Ils ne nous intéresseront donc pas dans la mesure où ils ne présentent pas d'anomalies morphologiques ou anatomiques, faute de développement (cf. tableau XXXI).

— Les sporophytes cultivés sur les quatre solutions suivantes : « Ca hypo/Mg hyper/K hyper »; « Ca opt/Mg hyper/K hypo ou K opt ou

(1) Nous reviendrons sur ce point ultérieurement (cf. p. 289).

K hyper » (cf. tableau XXXI) meurent au cours ou à la fin du deuxième passage. Avant de mourir, ils présentent des modifications telles qu'ils ont été étudiés du triple point de vue de leur morphologie, de leur croissance et de l'anatomie de leur rhizome.

1^o Sporophytes cultivés sur le milieu à « Ca hypo Mg hyper K hyper ».

a. *Aspect morphologique et croissance.* — Dès le premier passage, les sporophytes, qui occupent le fond des tubes de culture, sont chétifs et entièrement bruns (fig. 50). Seuls les bourgeons caulinaires, principaux

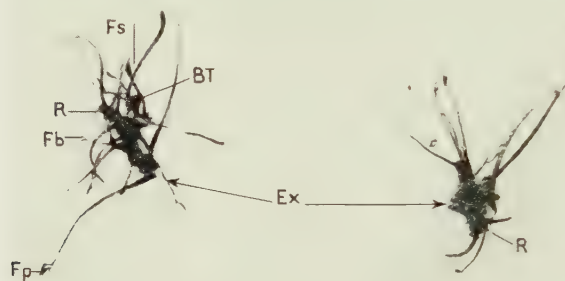


FIG. 50. — Aspect morphologique d'un sporophyte cultivé sur le milieu à « Ca hypo Mg hyper K hyper » pendant 2 passages ($\times 2$).

Le sporophyte « ramifié » porte des feuilles du type juvénile

Ex, emplacement de l'explantat ; BT, bourgeon terminal ; R, ramification ; Fp, feuille palmée ; Fb, feuille bifide ; Fs, feuille spatulée.

ou latéraux, demeurent plus longtemps chlorophylliens. Les racines sont si courtes qu'il faut les observer à la loupe pour les voir.

Les feuilles, palmées dans la région proche de l'explantat, sont bifides puis spatulées au niveau des régions plus jeunes. Leurs folioles nécrosées sont toutes minuscules.

Les bourgeons latéraux portés par le rudiment de rhizome se développent en ramifications dont la taille peut atteindre celle de l'axe principal et forment des feuilles toutes de type juvénile.

L'observation n'a pas montré, chez de telles cultures, la présence de ramifications de second ordre. Malgré ces anomalies, les modalités de développement des deux bourgeons de l'explantat restent normales : le rhizome dominant, si peu étiré soit-il, est plus long que l'ébauche d'axe habituellement observée.

Concrétisant ces données, la chute de croissance est supérieure à 50 p. 100.

La mortalité, nulle au cours du premier passage, est totale au second.

b. *Structure anatomique du rhizome.* — Le diamètre du rhizome des cultures mortes de deuxième passage est inchangé. La stèle, plus déve-

loppée que celle des témoins, présente une anomalie frappante : les trachéides scalariformes, petites, peu nombreuses, ont un contour sinueux et leurs parois, très épaisses, ne se colorent ni par le vert d'iode ni par les autres réactifs de la lignine : elles sont roses ou nacrées (fig. 54). En

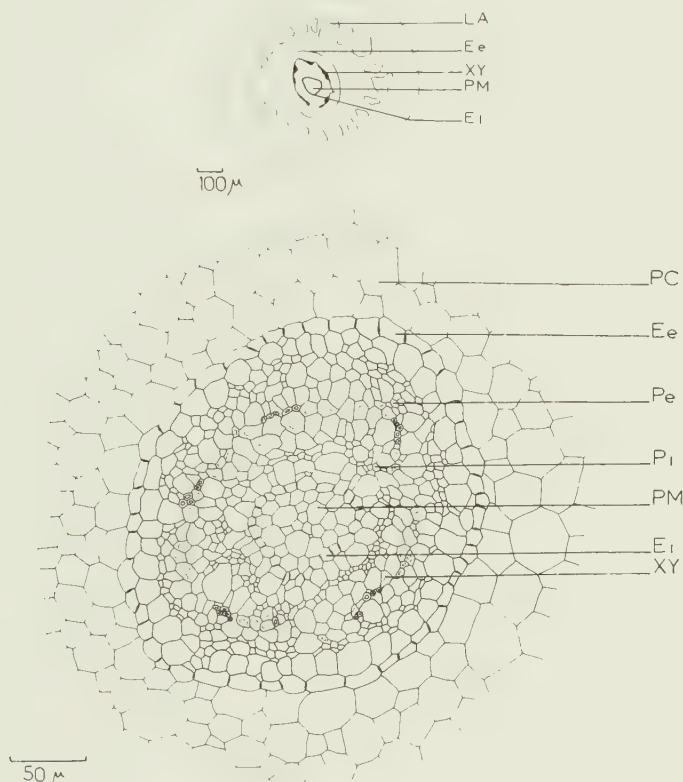


FIG. 51. — Structure anatomique du rhizome d'un sporophyte de *M. d.* cultivé sur le milieu à « Ca hypo/Mg hyper/K hyper ».

Les cellules de l'endoderme externe sont hyperthrophées.

La paroi des trachéides non colorée par le vert d'iode a été représentée par un trait pointillé (troubles de la lignification).

LA, lacune aërifère de l'aérenchyme ; PC et PM, parenchymes cortical et médullaire ; Ee et Ei, endodermes externe et interne ; Pe et Pi, phloèmes externe et interne ; XY, xylème.

outre, les cellules de l'endoderme externe, des péricycles, des parenchymes cortical et xylémien, sont plus ou moins hypertrophées.

Comme nous l'avons déjà observé dans d'autres cas, l'épaississement radial des cellules endodermiques ne présente pas de troubles de la lignification. La moelle est peu modifiée.

2° Sporophytes cultivés sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper K hypo ». —

a. *Morphologie et croissance.* — Les sporophytes ne diffèrent pas beaucoup des précédents : les conditions défavorables d'un milieu moins pauvre

en calcium, mais aussi moins riche en potassium, n'ont pas permis leur survie au-delà du deuxième passage. Leur rhizome se ramifie; les feuilles réduites sont du type juvénile. Notons aussi la présence épisodique de rameaux latéraux de second ordre.

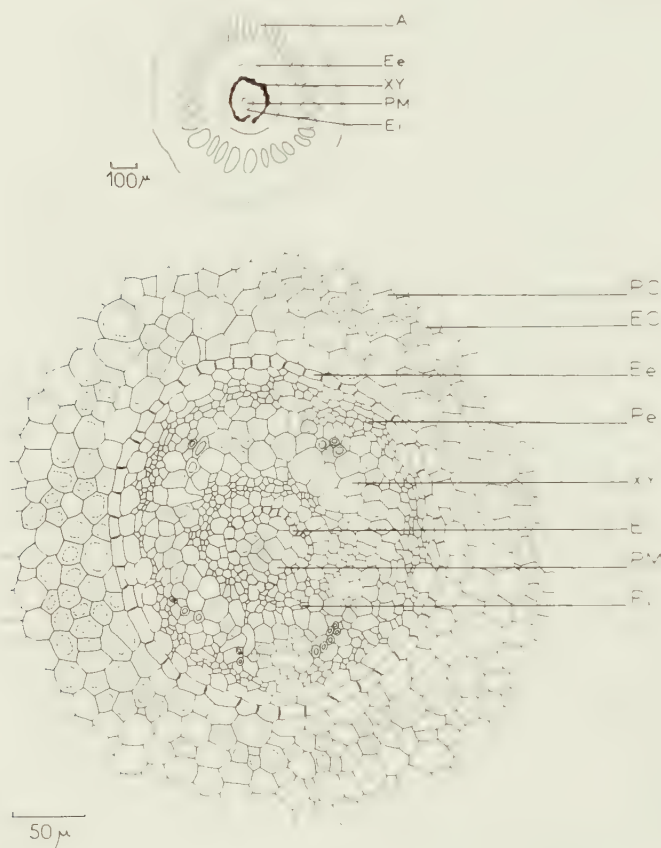


FIG. 52. — Structure anatomique du rhizome d'un sporophyte de *M. d.* cultivé sur le milieu à « Ca opt Mg hyper K hypo ».

Les cellules du parenchyme cortical présentent des épaississements celluloseux de leur membrane. Les cellules de l'endoderme externe sont hypertrophiées. La paroi des trachéides n'est pas lignifiée; celle-ci, non colorée par le vert d'iode, a été représentée par un trait pointillé.

LA, lacune aërienne de l'aérenchyme; PC et PM, parenchymes cortical et médullaire; EC, épaississement cellulosique; Ee et Ei, endodermes externe et interne; Pe et Pi, phloèmes externe et interne; XY, xylème.

b. *Structure anatomique du rhizome.* — Les modifications sont, là encore, du même ordre. Les trachéides, plus nombreuses et moins réduites, présentent les mêmes caractéristiques de leurs parois. On observe en outre l'épaississement de la membrane pecto-cellulosique des cellules des parenchymes cortical et médullaire. Fait nouveau, la moelle est sensiblement réduite (fig. 52).

3^o *Sporophytes cultivés sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper K opt ».* — Moins défavorable que les deux précédents, ce milieu occasionne les plus frappantes, les plus nettes des anomalies provoquées par l'excès de magnésium dans une combinaison par ailleurs optimale.

a. *Aspect morphologique et croissance.* — Au cours des deux passages permettant la vie, les modalités de développement des explantats restent normales.

— *Au bout des premiers quarante-cinq jours*, les sporophytes, tous



FIG. 53. — Aspect morphologique d'un sporophyte de *M. d.* cultivé sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper/K opt » pendant un 1^{er} passage.

A tous les nœuds du rhizome, les bourgeons latéraux sont entrés en activité et ont donné des ramifications. Les feuilles secondaires portées par ces axes d'ordre 1 sont très sous-développées.

Ex, explantat ; *BT*, bourgeon terminal ; *BL*, bourgeon latéral ; *Eb*, ébauche de rhizome due au fonctionnement du bourgeon latéral rapidement inhibé par le développement du rhizome dominant ; *R1*, ramification d'ordre 1.

vivants, sont de petite taille. Les régions méristématiques et les très jeunes feuilles sont les seules parties épargnées par la nécrose. Le rhizome, normalement allongé, porte des nœuds plus nombreux où sont localisées des feuilles faiblement pétiolées à quatre folioles réduites et des racines noires, très courtes et cassantes (fig. 53). A la base de chacune de ces feuilles, les bourgeons extra-axillaires se sont développés en un rameau latéral rudimentaire porteur de racines nécrosées et de feuilles chlorotiques peu développées : elles restent à l'état d'ébauches et sont soit quadrifides, soit bifides. Les ramifications les plus longues sont aussi les plus proches de l'explantat.

— *A la fin du deuxième passage* (fig. 54), les axes latéraux sont plus longs et plus feuillus. Les nécroses, plus importantes, épargnent encore quelques points végétatifs terminaux ou latéraux. Les feuilles secondaires

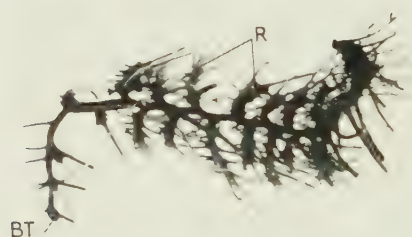


FIG. 54. — Aspects morphologiques des sporophytes de *M. d.* cultivés sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper, K opt » pendant 2 passages consécutifs ($\times 2$).

En haut : culture d'été. — *Ex*, explantat ; *BT* et *BL*, bourgeons terminal et latéral.

Au milieu : vue de détail du rhizome de la culture représentée *en haut* après ablation des feuilles et des racines. Noter que, dans la région apicale, les ramifications sont peu développées. — *En bas* : culture d'hiver. Moins développée que la culture d'été, elle porte des feuilles de type juvénile plus nombreuses. Ses nœuds sont plus rapprochés, d'où son aspect plus touffu.

BT, bourgeon terminal ; *R*, ramification.



sont le plus souvent bifides. Les bourgeons placés à la base de celles-ci sont anormalement gros et se développent parfois en ramifications de deuxième ordre. Ces cultures ne supportent pas un troisième repiquage.

Le tableau XXXIII groupe les valeurs de l'accroissement pondéral

TABEAU XXXIII. — ACCROISSEMENT PONDÉRAL DES SPOROPHYTES CULTIVÉS SUR LE MILIEU A « Ca opt/Mg hyper/K opt » PENDANT LE PREMIER PASSAGE.

ÉPOQUE DE LA PESÉE ET « AGE » de la souche.	ACCROISSEMENT PONDÉRAL (exprimé en % de la valeur témoin).
R ₇ : hiver.....	41 %
R ₁₀ : hiver.....	28 %
R ₁₈ : printemps	48 %
R ₁₉ : printemps	43 %
R ₂₃ : été	72 %
R ₂₅ : été	38 %
R ₂₇ : printemps	47 %

des sporophytes de premier passage cultivés à différentes périodes de l'année : on remarquera combien il est diminué et, malgré deux anomalies (cultures R¹⁰ et R²³), constant.

b. *Structure anatomique du rhizome.* — Les modifications de la structure du rhizome principal et de sa stèle sont analogues au cours des deux passages étudiés.

— Au niveau des six premiers entre-nœuds, l'observation montre que les éléments xylémiens sont tous différenciés au deuxième entre-nœud, c'est-à-dire beaucoup plus précocement que lorsque les conditions de vie sont normales.

— Au niveau du quatrième entre-nœud, le diamètre de l'axe n'est pas modifié. Cependant, les lacunes aérifères sont réduites, les cellules du parenchyme cortical, très épaissies par un dépôt de cellulose. L'endoderme est hypertrophié. La paroi des trachéides (petites et au contour nettement polygonal) ne se colore pas par les réactifs habituels de la

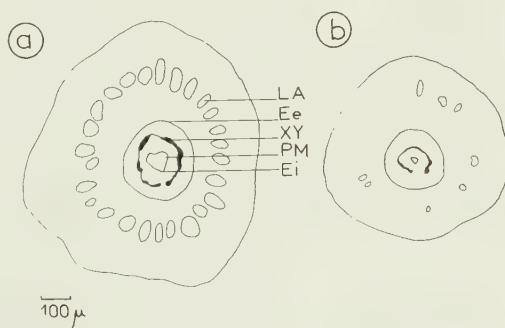


FIG. 55. — Schémas de coupes pratiquées dans les rhizomes principaux et latéraux de sporophytes cultivés sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper/K opt ».

a : rhizome principal (4^e entre-nœud). — b : ramification (4^e nœud).

LA, lacune aérifère de l'aérenchyme ; Ee et Ei, endodermes externe et interne ; XY, xylème ; PM, parenchyme médullaire.

lignine. Seuls les éléments du protoxylème se comportent, à cet égard, normalement (fig. 55 et 56, *a*).

Ce sont les rhizomes secondaires qui présentent les changements les plus spectaculaires : de petit diamètre, l'axe latéral comporte des lacunes aérifères très réduites (fig. 55 et 56, *b*). De place en place, le parenchyme cortical présente de grandes cellules. L'endoderme est très hypertrophié. La stèle, enfin, montre, en plus des modifications observées au niveau du rhizome principal, une moelle réduite qui comporte au maximum quatre cellules.

4° *Sporophytes cultivés sur le milieu à « Ca opt Mg hyper K hyper ».*

— Ce milieu ne diffère des précédents que par la présence d'une forte concentration en potassium. Cette seule modification de composition permet la survie des cultures au-delà du troisième passage. La présence d'un excès de magnésium provoque encore ici une perturbation dans les phénomènes de dominance apicale, mais plus atténuée grâce à l'excès de potassium. En conséquence, les bourgeons latéraux se développent moins intensément, mais on peut encore voir à l'œil nu les deux ébauches foliaires qu'ils forment. Cependant, ce grossissement anormal ne s'accompagne pas de la formation de rameaux latéraux.

EN RÉSUMÉ, les milieux trop pauvres en calcium et trop riches en magnésium occasionnent des changements importants dans le développement du *Marsilea* : la croissance est faible, la mort rapide ; les nécroses n'épargnent pas toujours les méristèmes caulinaires, foliaires et radiculaires. Les racines et les feuilles (souvent simplifiées) sont très sous-développées. Le rhizome est ramifié. Il est primordial de remarquer que ces modifications ne sont provoquées que par l'insuffisance de calcium par rapport au magnésium puisqu'elles ne s'observent pas dans le cas de solutions qui en sont richement pourvues : en particulier, sur les milieux à « Ca hyper », le rhizome principal des sporophytes ne porte pas de rameaux latéraux.

C. — ROLES JOUÉS PAR LE CALCIUM ET LE MAGNÉSIUM DANS LES PHÉNOMÈNES DE DÉVELOPPEMENT DES BOURGEONS LATÉRAUX.

Ces dernières observations doivent-elles nous conduire à accorder un rôle capital au rapport Ca/Mg ? Ses variations peuvent-elles contribuer à expliquer la ramification des sporophytes de *Marsilea* ?

Pour répondre à ces questions, nous ferons appel, d'une part, aux résultats de nouvelles expériences et, d'autre part, à ceux recueillis au cours des chapitres III et IV dans lesquels différents milieux à concentrations variables en Ca^{++} et en Mg^{++} sont déjà connus pour les effets qu'ils produisent.

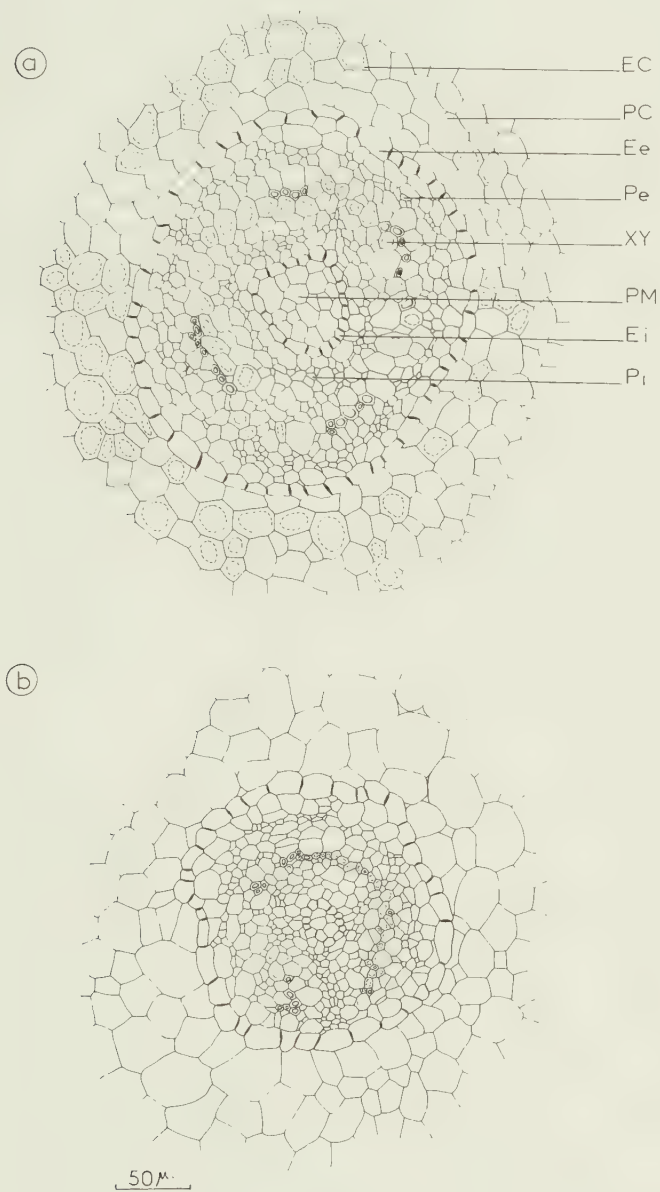


FIG. 56. — Structure stélisque des rhizomes principaux et latéraux des sporophytes cultivés sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper/K opt ».

a : rhizome principal (4^e entre-nœud). — *b* : ramification (4^e nœud).

La membrane de quelques cellules du parenchyme cortical est épaissie par un dépôt de cellulose. Les cellules de l'endoderme externe sont hypertrophiées. Les trachéides présentent des troubles de la lignification de leur paroi : celle-ci, non colorée par le vert d'iode, a été représentée par un trait pointillé.

Au niveau de la ramification, la moelle est très réduite.

PC et *PM*, parenchymes cortical et médullaire ; *EC*, épaississement cellulosique ; *Ee* et *Ei*, endodermes externe et interne ; *Pe* et *Pi*, phloèmes externe et interne ; *XY*, xylème.

1^o *Étude de la carence double en calcium et en magnésium.* — Seule la double carence en Ca^{++} et Mg^{++} a été envisagée. En effet, nous avons vu que les relations K/Ca et K/Mg sont peu importantes. D'autre part, il est important de remarquer que la ramification des rhizomes est provoquée soit par une carence totale en calcium (cf. p. 211), soit par un excès de magnésium par rapport à la concentration en ions calciques, même dans le cas où celle-ci est optimale. Bien que, dans le milieu de Knop, la concentration en ions magnésiens soit inférieure à celle déterminée comme optimale, on peut se demander si le développement des ramifications constaté dans le cas de carence totale en calcium n'est pas dû à un déséquilibre Ca/Mg , le magnésium étant alors en excès. Pour déterminer la raison

profonde du buissonnement de certaines cultures de *M. d.*, nous avons donc recherché l'influence d'une carence double en Ca Mg .

L'essai a comporté deux passages. La substitution par des sels de sodium a permis la suppression du calcium et du magnésium du milieu.

— Dès le premier passage, les sporophytes se développent très mal; ils sont chétifs, nécrosés et ramifiés. Les rameaux latéraux sont touffus. L'ensemble de la culture est comparable au type 3 déjà décrit (fig. 57, cf. fig. 15, a).

— La croissance, encore diminuée à la fin du deuxième passage, est accompagnée des mêmes anomalies morphologiques.

FIG. 57. — Aspect morphologique d'un sporophyte de *M. d.* cultivé sur un milieu doublement carencé en calcium et en magnésium ($\times 0,8$).

Très ramifiée, la culture ne diffère pas de celle observée sur un milieu uniquement privé de calcium (cf. fig. 15 a).

Les sporophytes ne supportent pas un troisième passage. Il n'est pas inutile de remarquer que la mort aussi rapide des cultures privées seulement de magnésium a déjà été noté (p. 234).

Ainsi, la carence double en calcium et en magnésium, loin de rétablir le développement normal des sporophytes, augmente la vitesse d'apparition des troubles caractéristiques de l'absence de calcium. Aux lésions que cette dernière provoque, parmi lesquelles on retiendra le buissonnement de l'axe principal, s'additionnent celles dues au manque de magnésium; lésions rapides et si profondes à brève échéance qu'elles aboutissent à la mort des sporophytes, qu'ils soient ou non privés de calcium. Des résultats de ce premier essai, il est légitime de conclure que *la réponse du Marsilea est conditionnée par le manque de calcium et non par un excès de magnésium dans le milieu carencé.*

2^o *Variations de la teneur en magnésium d'un milieu dépourvu de calcium.* — Les observations précédentes ont montré que les troubles

de la dominance apicale doivent être attribués à l'absence de calcium. Malgré leur netteté, nous avons vérifié ces premiers résultats en entreprenant l'étude des effets produits par des milieux dépourvus de calcium et contenant des concentrations variables de magnésium (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 1, 5 mI l).

— Aux doses inférieures ou égales à 0,5 mI/litre (concentration du milieu témoin), les sporophytes de premier passage sont tous du type 1 (cf. p. 210).

Abaisser la teneur du milieu en magnésium ne provoque pas d'améliorations de l'état des sporophytes : ils se ramifient.

— A la concentration de 1 mI, au bout de quarante-cinq jours, la moitié des cultures est du type 1, l'autre du type 2. Les cultures qui survivent au deuxième repiquage (5 sur 12) sont toutes du type 3.

Les plants les plus ramifiés sont donc plus nombreux lorsque la teneur en magnésium est double de celle utilisée au cours de nos premiers essais (cf. tableau IX et fig. 14).

En présence de 5 mI, les explantats meurent sans avoir repris, quelques jours après leur premier repiquage.

Ces résultats sont nets : *il est impossible d'atténuer les troubles provoqués par l'absence de calcium en abaissant le taux de magnésium*. On doit donc conclure, comme précédemment, à la nécessité absolue du calcium ; d'elle seule dépendent les réactions du *Marsilea* vis-à-vis du magnésium. On peut ajouter que le magnésium est très rapidement toxique si le calcium fait défaut.

3° Importance du rapport Ca/Mg sur le développement normal ou aberrant du sporophyte de « Marsilea ». — Si la ramification des sporophytes cultivés sur milieu dépourvu de calcium ne provient que de l'absence de cet élément, pour les autres milieux qui la provoquent on peut se demander si le rapport Ca/Mg n'intervient pas. Pour mettre en évidence son rôle éventuel, nous avons fait appel à deux groupes de milieux dont nous connaissons déjà les effets et qui diffèrent par la valeur relative de leurs concentrations en calcium et en magnésium qui est soit très faible, soit très forte.

DANS LE PREMIER GROUPE choisi comme exemple, le rapport Ca/Mg est *faible*.

— Un premier milieu ne diffère du milieu témoin que par sa concentration très réduite en calcium : 0,01 mI/litre (cf. p. 225).

— Un deuxième, au contraire, contient la quantité de calcium habituelle et diffère du milieu de référence par sa forte teneur en Mg^{++} : 64 mI (cf. p. 236).

— Le dernier est étudié dans ce chapitre sous le nom de milieu à « Ca opt/Mg hyper » (cf. p. 283).

Les rapports des concentrations ioniques sont respectivement égaux à 0,02, 0,031, 0,017. Dans ces trois exemples, les variations du rapport

Ca/Mg sont de peu d'importance si l'on se rappelle l'insensibilité du sporophyte à son égard, noté p. 279. Or, les effets de ces trois solutions nutritives sur le *Marsilea* sont très différents. Les deux premières permettent une croissance normale des plants alors que la troisième provoque intensément leur ramification. Il n'est donc pas permis de penser que le rapport interionique puisse seul être tenu responsable de la formation des rhizomes latéraux. *Il faut, en outre et en même temps, considérer les concentrations absolues qui servent à l'établissement de ce rapport.*

DANS LE DEUXIÈME GROUPE, le rapport Ca/Mg est *très élevé*. On mentionnera deux milieux :

— milieu témoin dont le calcium a été fortement augmenté (60 mI/litre) (cf. p. 226) ;

— milieu à « Ca hyper/Mg hypo », étudié dans ce chapitre (cf. p. 276).

Les grandeurs du rapport interionique, égales respectivement à 120 et 100, sont voisines. Or, les effets de ces deux milieux sont différents : le premier provoque une ébauche de ramification, le second assure, de ce point de vue, une croissance normale.

En considérant le cas inverse du précédent, celui où le calcium est plus abondant que le magnésium, on aboutit donc à une conclusion semblable.

4^o Conclusions. — De l'ensemble de ces observations, il ressort que :

a. La latence des bourgeons latéraux du sporophyte de *Marsilea* n'est possible qu'en présence de calcium. En son absence, leur inhibition normale est levée, provoquant en conséquence la ramification de la plante, quelle que soit la quantité de magnésium présente dans le milieu carencé.

b. Si le calcium est présent, mais en quantité insuffisante, la toxicité du magnésium se manifeste par le buissonnement intense des cultures et leur mort, à brève échéance : c'est que la concentration *absolue* de l'ion Ca^{++} est trop faible pour exercer, vis-à-vis de l'ion Mg^{++} , son action antagoniste.

c. En présence de calcium, le rapport Ca/Mg peut varier dans de très larges limites sans provoquer de modifications dans la latence des bourgeons latéraux. *C'est qu'il faut tenir compte des valeurs absolues des concentrations des deux cations en même temps que de leurs valeurs relatives.*

d. Sans diminuer le rôle important joué par le magnésium, sans nier non plus la force de l'interaction Ca/Mg, il n'est pas douteux que l'absence, l'insuffisance ou l'excès de calcium sont responsables des troubles de croissance et tout particulièrement de ceux qui affectent la dominance apicale.

D. — RECHERCHES COMPLÉMENTAIRES SUR LES SPOROPHYTES CULTIVÉS SUR LE MILIEU A « CA OPT/MG HYPER/K OPT ».

Les sporophytes développés sur ce milieu présentant un comportement analogue à celui des sporophytes carencés en calcium, nous avons effectué les mêmes expériences et les mêmes analyses que pour ces derniers.

1^o **Teneur en eau.** — Les données numériques sont groupées dans le tableau XXXIV : les cultures ramifiées sont moins riches en eau que les

TABLEAU XXXIV. — TENEUR EN EAU DES TISSUS DE SPOROPHYTES CULTIVÉS SUR LE MILIEU A « Ca opt/Mg hyper/K opt », PENDANT UN PREMIER PASSAGE DE QUARANTE-CINQ JOURS.

TYPES DE CULTURES.			
Témoins.		Cultures aberrantes.	
R ₁₉	88,6 %	R ₁₉	73,2 %
R ₂₇	86,5 %	R ₂₇	74,5 %

témoins. Le taux de déshydratation cellulaire est voisin de celui mesuré dans les tissus carencés en calcium prélevés sur des sporophytes des types 2 et 3 (tableau XII). Ces résultats vérifient et confirment qu'il existe un rapport étroit entre croissance et métabolisme hydrique.

2^o **Transplantation sur milieu témoin des sporophytes ramifiés.** — Transplantés *entiers* sur le milieu de référence, les sporophytes cultivés pendant un premier passage sur la solution nocive présentent deux types de réactions.

a. Chez la moitié des cultures ainsi traitées, les deux rhizomes, de tailles inégales, provenant des deux bourgeons de l'explantat originel, se développent en un axe (Rh. N, fig. 58) qui porte de longues racines blanches et des feuilles normales longuement pétiolées (expérience effectuée en hiver). Les bourgeons situés à la base de celles-ci sont normaux. Les rameaux latéraux des anciens rhizomes, Rh. A, devenus bien chlorophylliens dans leurs régions néo-formées, sont tôt arrêtés dans leur croissance. C'est que l'apex principal n'est pas endommagé sérieusement au cours du premier passage sur le milieu « déséquilibré » en Ca et Mg puisqu'il peut, lorsqu'il est remis dans de bonnes conditions, se développer normalement. Cependant, l'allongement presque égal des deux axes Rh. N montre que l'apex de l'un ne peut inhiber l'activité de l'autre, comme nous l'observons habituellement : il faut penser que les processus d'inhibition — en admettant qu'ils soient le seul fait du bourgeon terminal — sont gênés par la distance ou la structure des deux portions formées au cours du premier passage.

b. Chez l'autre moitié des sporophytes expérimentés, l'apex principal, irrévocablement lésé, ne montre aucune reprise d'activité (fig. 59, *a* et *b*). Seules les ramifications se développent après la transplantation de la

culture entière sur milieu favorable. Les moins longues, au bout de quarante-cinq jours, portent des feuilles chlorophylliennes successivement une, deux et quatre foliolées : elles se comportent, du point de vue foliaire, comme de très jeunes plantules. Dans d'autres cas, les rameaux latéraux



FIG. 58. — Aspect morphologique d'un sporophyte de *M. d.* cultivé pendant 45 jours sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper/K opt », puis transplanté entier sur milieu témoin.

RhN est dans ses conditions favorables, le sporophyte se développe normalement

RhA, rhizome « ancien » formé avant la transplantation (fortement nécrosé, il porte des organes très sous-développés) ; RhV, rhizome formé après la transplantation

les plus développés forment autant de « sporophytes normaux » (fig. 59 a). Ces derniers sont placés près de l'apex principal BT de l'ancien rhizome.

L'hétérogénéité de comportement des ramifications latérales provient sans doute de l'importance des lésions (nécroses) qui ont affecté leurs méristèmes caulinaires.

3^o Essais de milieux à « Ca opt/K opt » et à Mg variable. — Les milieux envisagés dans ce paragraphe dérivent du milieu à « Ca opt Mg hyper K opt » et n'en diffèrent que par leur teneur variable en ions magnésium.

L'abaissement du taux de magnésium du milieu n'entraîne-t-elle pas la diminution ou la disparition des anomalies observées ?

Le milieu contient normalement 30 ml Mg litre. Nous avons donc composé des solutions à 10, 15, 20 et 25 ml. Il n'est pas inutile de rappeler ici que les concentrations en Mg, par rapport à l'optimum (2 ml), sont encore très supérieures à ce qu'elles devraient être.

Au bout de quarante-cinq jours, les douze sporophytes cultivés en présence de 20 ou 25 ml ne diffèrent pas de ceux habituellement observés : la ramification y est aussi intense.

Sur le milieu à 15 ml, l'aspect morphologique et la croissance sont presque normaux : les feuilles sont bien développées et normalement



a



b

FIG. 59. — Autres aspects morphologiques des sporophytes de *M. d.* cultivés sur le milieu à «Ca opt/Mg hyper/K opt» pendant quarante-cinq jours, puis transplantés entiers sur milieu témoin ($\times 2$).

a : le bourgeon terminal *BT* du sporophyte ramifié est nécrosé : après la transplantation, il ne forme pas de nouveaux organes. Les bourgeons des ramifications (bourgeons latéraux entrés en activité) demeurés vivants forment, dans ces conditions, autant de sporophytes normaux (dont on ne voit sur la figure qu'une partie des organes). — *b* : autre aspect d'un sporophyte soumis au même traitement que *a*. Les régions formées avant la transplantation sont très nécrosées. Après, les ramifications se développent. On remarquera qu'elles portent des feuilles de type juvénile.

pigmentées. Les racines sont brunâtres et encore assez courtes. Les bourgeons latéraux, un peu gros, ne montrent pas de feuilles visibles à l'œil nu.

— Sur le milieu pourvu de 10 mI, les sporophytes ne diffèrent pas des témoins.

Pour obtenir le développement normal du *Marsilea*, il ne faut donc pas ajouter plus de 10 mI Mg à un milieu qui contient par ailleurs la concentration optimale de calcium (et de potassium). Ces résultats confirment nos conclusions précédentes concernant la toxicité du magnésium si le calcium est proportionnellement insuffisant. Dans le cas présent, la valeur du rapport Ca/Mg est très faible : 0,05, et pourtant le développement du sporophyte est normal. Comme précédemment, nous devons conclure que la valeur relative des concentrations ioniques importe moins que leurs valeurs absolues. En outre et en même temps, il y a intérêt à connaître la quantité en milligrammes des deux ions autant que leur rapport.

2° Effets des variations simultanées de la concentration en anions.

L'étude des interactions anioniques a été effectuée suivant la même méthode que précédemment : pour chaque anion (NO_3^- , SO_4^{--} , PO_4H_2^-), trois concentrations ont été considérées dont les valeurs figurent dans le tableau XXXV. On les nommera concentrations « hypo », « opt » et

TABLEAU XXXV. — VALEURS DES CONCENTRATIONS DE CHAQUE ANION PRÉSENTES DANS LES DIFFÉRENTS MILIEUX NUTRITIFS.

CONCENTRATIONS (exprimées en mI/litre).	NATURE DE L'ANION.		
	NO_3^-	SO_4^{--}	PO_4H_2^-
« Hypo »	0,5	0,1	0,25
« Opt »	4,2	0,25	2
« Hyper »	20	10	30

« hyper ». Vingt-sept milieux différents ont, là encore, été composés. Les données numériques relatives à l'accroissement pondéral sont consignées dans le tableau XXXVI et illustrées par les courbes de la figure 60.

De l'examen de ces données, il apparaît que :

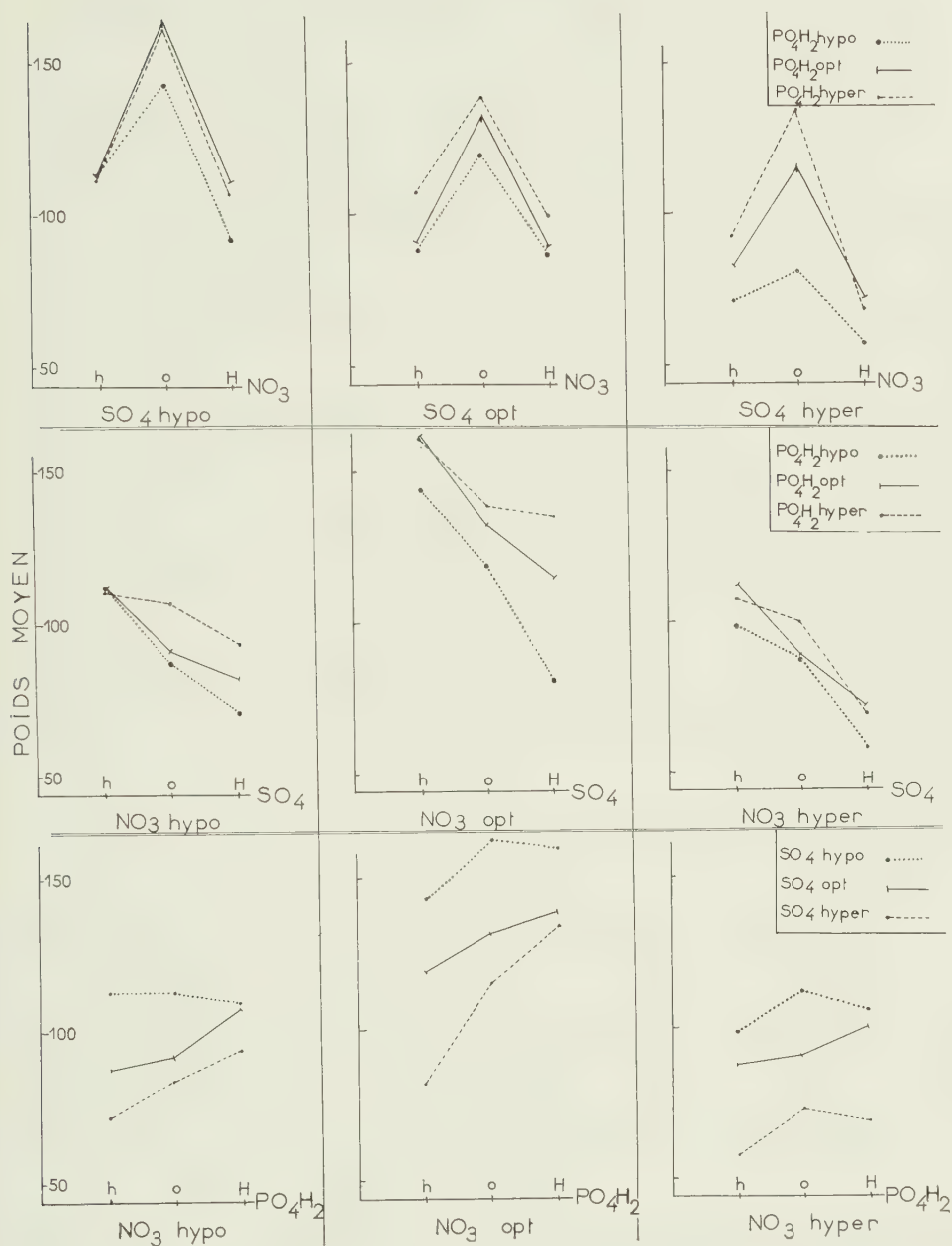


FIG. 60. — Influence de différentes combinaisons anioniques sur l'accroissement pondéral des sporophytes de *M. d.* : action propre à un anion donné, quelle que soit la concentration des deux autres anions qui l'accompagnent.

On remarquera que pour chacun des anions étudiés les trois courbes sont parallèles.

1° *L'allure générale des courbes propres à un anion donné est la même, quelles que soient les concentrations des deux autres anions.*

— Lorsque l'apport en ions NO_3^- augmente, les valeurs pondérales augmentent, passent par un maximum, puis diminuent, et cela pour toutes les concentrations en ions SO_4^{--} et $\text{PO}_4 \text{H}_2^-$.

— On peut tirer une conclusion identique de l'examen des courbes fournies par les ions sulfuriques : indépendamment de la teneur des milieux en ions nitriques et phosphoriques, la croissance est toujours diminuée si l'on augmente la teneur en sulfates.

— Enfin les variations en ions $\text{PO}_4 \text{H}_2^-$ ne modifient guère la croissance en quarante-cinq jours du sporophyte, quelles que soient les concentrations en ions NO_3^- et SO_4^{--} .

Ce résultat permet de penser que *chacun des ions considérés agit pour son propre compte, indépendamment des deux autres ions qui l'accompagnent* : s'il y a des liaisons entre eux, celles-ci sont, ou bien très faibles, ou bien masquées par l'action isolée de chaque anion. L'analyse de variance précise ce résultat.

On voit que (tableau XXVII) les variations de la concentration en ions nitriques et sulfuriques considérées dans leur ensemble modifient significativement la croissance du sporophyte. Au contraire, les variations de la teneur en ions phosphoriques sont sans effets sur elle.

TABLEAU XXXVII. — ACTION ISOLÉE DE CHAQUE ANION.

F (calculé).	F (tables)	
	au seuil 0,05	au seuil 0,01
$\text{FNO}_3 = 17,84$	3,49	5,85
$\text{FPO}_4 = 2,82$	3,49	5,85
$\text{FSO}_4 = 17,96$	3,49	5,85

2° *Entre les trois catégories d'anions, il existe cependant une légère interaction.*

Nous venons de voir que chacun des trois anions agit pour son propre compte. Si des liaisons existent entre eux, elles doivent être faibles ou bien masquées.

Si l'on consulte les données numériques fournies par l'analyse de variance (tableau XXXVIII), on voit en effet qu'il existe une légère interaction entre les ions NO_3^- et SO_4^{--} : la toxicité du soufre peut être atténuée par une réduction de l'apport azoté. Les ions nitriques et sulfuriques sont donc antagonistes.

Notons, d'autre part, qu'il n'y a pas d'influence réciproque entre les nitrates et les phosphates, ni entre les phosphates et les sulfates.

TABLEAU XXXVIII. — DÉTERMINATION DES INTERACTIONS ENTRE ANIONS PAR ANALYSE DE VARIANCE.

F (calculé).	F (tables)	
	au seuil 0,05	au seuil 0,01
$\text{FNO}_3 - \text{PO}_4 = 3,56$	3,84	7,01
$\text{FPO}_4 - \text{SO}_4 = 1,38$	3,84	7,01
$\text{FSO}_4 - \text{NO}_3 = 6,23$	3,84	7,01

L'étude des variations simultanées de la concentration de chacun des trois ions négatifs montre que seuls les effets propres de ces derniers sont importants. Leurs interactions sont faibles ou négligeables. Ce résultat mérite d'être noté car on le retrouve en étudiant la morphologie des cultures.

Quelle que soit la concentration des deux autres ions, chaque ion agit en effet par lui-même sur le sporophyte et provoque des modifications morphologiques spécifiques.

— Ainsi, l'appauvrissement du milieu en nitrates se traduit par la formation de racines brunes, épaisses et intensément ramifiées, et cela, quelle que soit la teneur en phosphates et en sulfates (p. 251).

— De même, comme nous l'avons noté page 262, l'effet caractéristique des sulfates administrés en excès est qu'ils conduisent à la formation d'un système racinaire anormal (racines noires, cassantes et dentelées). Cet effet n'est pas changé lorsqu'on modifie la teneur des milieux en ions NO_3^- et $\text{PO}_4 \text{H}_2^-$.

— Enfin, indépendamment de la teneur en nitrates et en sulfates, un excès de phosphates provoque la chlorose des organes verts et la sécrétion par les racines de produits bruns qui colorent le milieu de culture. Ces deux effets spécifiques des ions phosphoriques ont déjà été notés page 267.

3° Sur le tableau XXXVI, la zone délimitée par une ligne fermée comprend les milieux permettant les plus forts accroissements pondéraux, à l'exclusion de ceux qui provoquent la chlorose foliaire (milieux à $\text{PO}_4 \text{H}_2$ hyper).

Les combinaisons anioniques les plus favorables à la croissance sont donc :

« NO_3 opt SO_4 hypo $\text{PO}_4 \text{H}_2$ hypo »
 « NO_3 opt SO_4 hypo $\text{PO}_4 \text{H}_2$ opt »
 « NO_3 opt SO_4 opt $\text{PO}_4 \text{H}_2$ opt »

On remarquera qu'aucun des milieux « améliorés » ne contient une dose anionique « hyper ».

4° Si, sous l'influence de concentrations variées en anions, la morphologie du sporophyte est modifiée, rien de semblable ne peut être observé quant

à son anatomie. En présence de toutes les combinaisons anioniques étudiées, la configuration du rhizome et de sa stèle est normale. Point intéressant puisqu'il montre que les caractères extérieurs globaux du sporophyte (sa morphologie) réagissent avant ses caractères internes, c'est-à-dire sa structure anatomique. Ces derniers sont plus stables que les premiers lorsque les conditions nutritives deviennent défavorables.

Cette absence de modifications anatomiques notables, dans le cas présent, a déjà été observée (cf. tableau XXIX) lorsque les anions varient isolément.

REMARQUES. — Que les phénomènes d'interactions et plus spécialement d'antagonisme soient moins nets entre les anions qu'entre les cations ne doit pas surprendre outre mesure. En effet, les relations interioniques traduisent, le plus souvent, des modifications de la perméabilité cellulaire et surtout cytoplasmique. Elles sont plus spécialement sous la dépendance des cations. De plus, les anions sont directement engagés dans les synthèses organiques où les cations n'ont qu'une action indirecte, souvent en tant que « catalyseurs » [133]. On comprend dès lors que la variation de la concentration de l'un d'entre eux agisse immédiatement et efficacement sur la plante de manière qu'il ne soit pas possible d'établir alors des relations évidentes entre les effets que peut avoir cette variation et ceux qui sont provoqués par la variation d'un autre anion. On comprend aussi pourquoi HOMES [99 à 103], à la suite de nombreuses expérimentations, conclut que « les proportions en ions positifs et en ions négatifs qui déterminent l'optimum d'une formule sont indépendantes les unes des autres ». Aussi « la meilleure combinaison anionique est toujours la même, quelle que soit la combinaison cationique qui l'accompagne, et, inversement, que la meilleure combinaison cationique est toujours la même, quelle que soit la combinaison anionique qui la complète ».

3^e Proposition d'un milieu amélioré.

Au terme de cette étude, il reste à préciser maintenant si les milieux améliorés établis précédemment exaltent encore la croissance lorsqu'ils sont combinés entre eux. Pour parachever cette étude, nous avons envisagé l'action de solutions contenant les concentrations égales ou voisines de l'optimum ionique déterminé lorsque, d'une part, chaque ion varie isolément des autres (cf. chap. III), d'autre part, lorsque les cations ou les anions varient simultanément (cf. chap. IV).

A. — MILIEUX ÉTUDIÉS.

L'essai a porté sur l'action de douze milieux différents parmi lesquels le milieu témoin.

1^o Aux anions présents dans le milieu de référence ont été ajoutées les concentrations optimales des cations déterminées lorsque ceux-ci varient isolément (ces concentrations sont données tableau XXIX).

2° Aux cations présents dans le milieu de référence ont été, de la même manière, ajoutées les concentrations optimales en anions (cf. tableau XXIX).

3° A la meilleure combinaison cationique (p. 279) a été jointe la meilleure combinaison anionique (p. 298).

Comme, des deux études que nous avons faites au début de ce chapitre, il ressort trois formules différentes pour chaque type de combinaison, nous avons choisi le milieu à « Ca opt/Mg hypo/K opt » et celui à « NO_3^- opt/ SO_4 hypo/ PO_4 opt », chacun permettant la croissance maximale du sporophyte de *M. d.*

4° Pour compléter cet essai, nous avons, en outre, composé huit milieux contenant la même concentration en ions Ca^{++} (0,5 mI), NO_3^- (4,2 mI) et K^+ (1 mI) (ces doses sont optimales, que l'ion varie seul ou que s'effectuent les phénomènes d'interactions), mais qui diffèrent par leur teneur en sulfates, en phosphates et en ions magnésium.

a. Pour le magnésium, deux concentrations (0,5 et 1 mI) ont été choisies en fonction de celles déterminées comme étant optimales (0,1 et 2 mI). La forte différence existant entre ces deux dernières explique que seules des teneurs plus faibles que 2 mI aient été expérimentées.

b. Pour les ions sulfuriques, nous avons voulu vérifier que la concentration de 0,1 mI, qui s'était montrée légèrement insuffisante au cours de la première étude (cf. fig. 262) et suffisante dans deux cas sur trois au cours de celle-ci (cf. tableau XXXVI), est réellement valable. Nous l'avons comparée à celle de 0,25 mI.

c. Pour les ions PO_4H_2^- , bien que l'optimum soit le même dans les deux essais, il était intéressant d'expérimenter des doses plus fortes puisqu'elles sont tolérées et qu'au cours de l'étude précédente une concentration « hyper » a donné de très bons résultats (tableau XXXVI). Les concentrations choisies sont 2 et 5 mI.

Les résultats basés sur l'accroissement pondéral de cultures de quatrième passage sont donnés dans le tableau XXXIX : tous les milieux composés exaltent, à des degrés divers, la croissance. Cette exaltation appelle quelques remarques :

1° La comparaison des résultats fournis par les milieux 1 et 2 (tableau XXXIX) montre que les modifications apportées à la concentration en cations — sans tenir compte des relations qui existent entre eux — alors que les teneurs en anions sont celles du milieu témoin, se révèlent plus efficaces que les changements apportés dans les mêmes conditions à la concentration en anions.

2° La combinaison des deux meilleures solutions cationique et anionique améliore plus nettement la croissance. Ce résultat apporte une vérification de la théorie de HOMES résumée page 299.

TABLEAU XXXIX. — ACCROISSEMENT PONDÉRAL ET TENEUR EN EAU DES SPOROPHYTES CULTIVÉS SUR DIFFÉRENTS MILIEUX AMÉLIORÉS.

COMPOSITION DES MILIEUX.	Poids frais (exprimé en % de la valeur témoin).	TENEUR EN EAU (exprimée en % par rapport au poids frais).
Milieu de Knop dilué de son volume d'eau.	100	86,4
1° Optimums des cations (étude séparée) + anions du milieu témoin + Na.	127	87,7
2° Optimums des anions (étude séparée) + cations du milieu témoin + Cl.	111	87
3° Meilleure combinaison cationique + meilleure combinaison anionique.	140	87,4
Milieux à Ca^{++}, K^+, NO_3^- optimums accompagnés de : $\left. \begin{array}{l} \text{Mg}^{++} = 0,5 \text{ ml} \\ \text{SO}_4^{--} = 0,4 \text{ ml} \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{PO}_4\text{H}_2^- = 2 \text{ ml} \\ \text{PO}_4\text{H}_2^- = 5 \text{ ml} \end{array}$ $\left. \begin{array}{l} \text{SO}_4^{--} = 0,25 \text{ ml} \\ \text{SO}_4^{--} = 0,4 \text{ ml} \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{PO}_4\text{H}_2^- = 2 \text{ ml} \\ \text{PO}_4\text{H}_2^- = 5 \text{ ml} \end{array}$ $\left. \begin{array}{l} \text{Mg}^{++} = 1 \text{ ml} \\ \text{SO}_4^{--} = 0,25 \text{ ml} \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{PO}_4\text{H}_2^- = 2 \text{ ml} \\ \text{PO}_4\text{H}_2^- = 5 \text{ ml} \end{array}$	154 158 164 178 159 172 153 181	87,5 87,8 87,5 87,2 87,7 89,4 88,6 87,4

3° Les résultats fournis par les huit autres milieux composés sur lesquels la croissance est encore plus exaltée indiquent qu'entre les ions de signe contraire doivent exister des interactions. L'étude trop restreinte que nous en avons faite ne permet pas de déterminer quelles sont ces relations entre ions positifs et négatifs. Signalons que les deux valeurs choisies pour le magnésium et les sulfates sont également efficaces et qu'il y a intérêt à augmenter la concentration du milieu en phosphates.

B. — FORMULE DU MILIEU TYPE PROPOSÉ POUR OBTENIR
LA CROISSANCE MAXIMALE DU « MARSILEA ».

En se basant sur ces données, il est maintenant possible de proposer une solution saline qui augmente nettement la croissance du sporophyte de *M. d.*

La composition en est la suivante :

eau	1 000 cm ³
Cl ₂ Ca, anhydre	60 mg
Cl ₂ Mg, 6 H ₂ O	200 mg
NO ₃ Na	350 mg
SO ₄ Na ₂	80 mg
PO ₄ H ₂ K	150 mg
PO ₄ H ₂ Na	500 mg

Le milieu proposé contient donc, par litre :

0,54 mI Ca ⁺⁺	4,12 mI NO ₃ ⁻
0,98 mI Mg ⁺⁺	0,25 mI SO ₄ ⁻
1,1 mI K ⁺	5,26 mI PO ₄ H ₂ ⁻
8,5 mI Na ⁺	3 mI Cl ⁻

Sur la formule de cette solution minérale, quelques remarques s'imposent :

1° L'introduction des ions accompagnateurs Na⁺ et Cl⁻ ne peut avoir d'effets toxiques (cf. p. 209).

2° L'expérience a montré que, dans des conditions peu favorables (été trop chaud, mauvais état de souches...), il y a intérêt à abaisser la concentration en phosphates de 5 à 2 mI par litre. Il suffit alors d'ajouter aux cinq premiers sels énumérés 120 mg de phosphate monosodique au lieu de 500.

Ce milieu, comparé au milieu témoin, est donc quatre fois moins riche en calcium, deux fois plus riche en magnésium et deux à cinq fois plus riche en phosphates. Seule la concentration en nitrates est peu différente. Si l'on compare ce milieu à ceux exposés dans le tableau I, on remarque que toutes les solutions utilisées par nos prédécesseurs sont trop riches en calcium, en sulfates, en nitrates et en potassium (surtout la solution de

Hoagland n° 1 employée par VOTH et BLOOM), et trop pauvres en phosphates.

La figure 61, montrant l'aspect morphologique de deux sporophytes, l'un cultivé sur le milieu habituel, l'autre sur le milieu amélioré (septième passage), est éloquent. L'élongation importante du rhizome est due, vrai-



FIG. 61. — Comparaison des croissances obtenues sur le milieu témoin (100 p. 100) et sur le milieu amélioré (168 p. 100) ($\times 0,6$).

semblablement, à l'abaissement du taux de calcium, alors que l'augmentation du nombre des feuilles épanouies doit être, semble-t-il, attribuée soit à l'abaissement du taux des sulfates, soit à l'augmentation de celui des phosphates. Ne terminons pas sans signaler que l'élévation du poids frais de tous les sporophytes ne correspond pas à une plus forte hydratation des tissus (le pourcentage d'eau varie peu, comme le montrent les données groupées dans le tableau XXXIX), mais à une augmentation de matière vivante. Des observations anatomiques et cytochimiques ont permis de vérifier que l'amélioration apportée au poids final des cultures ne provient pas d'une accumulation de matières inertes de nature paraplasmique.

CHAPITRE V

ÉTUDE DES SPOROPHYTES RAMIFIÉS

Nous avons vu que certains milieux défavorables modifient considérablement la physionomie du *Marsilea*. Parmi les anomalies observées, la plus intéressante est la *ramification du rhizome* : les bourgeons latéraux — toujours inhibés dans leur développement sur tous les autres milieux étudiés — entrent en activité. Des recherches particulières ont donc été nécessaires pour tenter de déterminer les causes d'un tel comportement. Pour être menées à bien, elles devaient porter sur des cultures fortement ramifiées et susceptibles de survivre aux traitements auxquels elles sont soumises au moins pendant un ou deux passages. Pour ces raisons, les sporophytes carencés en calcium et ceux cultivés sur le milieu à « Ca opt. Mg hyper/K opt » ont été choisis. Ils ont été l'objet d'observations *analytiques* : détermination de leur contenu auxinique et de certains points relatifs à leur métabolisme, et *histologiques* : fonctionnement et structure de leurs points végétatifs terminaux et latéraux.

Pour compléter cette étude dont le but est d'élucider la nature des facteurs responsables de la ramification, une tentative en vue de provoquer le buissonnement des cultures témoins a été réalisée.

C'est l'ensemble des expériences effectuées dans ce sens que nous proposons d'exposer maintenant.

1^o Recherches des facteurs jouant un rôle dans le déterminisme de la ramification.

A. — RÔLE DES SUBSTANCES DE CROISSANCE : DÉTERMINATION DU CONTENU AUXINIQUE DES SPOROPHYTES TÉMOINS ET RAMIFIÉS.

On admet actuellement que l'inhibition des bourgeons latéraux placés sous l'apex principal est de nature hormonale. Il est donc légitime de se demander, dans nos expériences, si la ramification du rhizome n'est pas la conséquence de perturbations humorales. C'est pourquoi nous avons essayé de déterminer le contenu « auxinique » des témoins et des cultures ramifiées par les méthodes chromatographiques de partage sur papier. Ainsi pouvait-on espérer obtenir une réponse aux deux questions suivantes : les substances de croissance des plants normaux sont-elles différentes, en qualité et en quantité, de celles des sporophytes ramifiés ? Y a-t-il

des facteurs « auxiniques » spécifiques de l'inhibition — ou de la levée d'inhibition — des bourgeons latéraux ?

Avant d'exposer les résultats obtenus, il n'est pas inutile de rappeler que :

1° Tous les sporophytes envisagés ici, normaux ou aberrants, ont été cultivés et traités en même temps, dans les mêmes conditions, précautions prises aussi pour la chromatographie et les tests biologiques auxquels sont soumis les extraits : ainsi sont évitées les fluctuations saisonnières pouvant affecter le développement des plants et éliminées toutes différences provenant de conditions extra-expérimentales.

2° Les sporophytes carencés en calcium peuvent être de plusieurs types (cf. p. 210) : aussi, ceux de type 1, peu ramifiés, ont-ils été traités séparément de ceux groupés dans les types 2 et 3, plus ramifiés.

3° Sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper/K opt », le buissonnement des cultures est beaucoup plus intense dès le premier passage que sur le milieu dépourvu de calcium.

1° Observations préliminaires. — a. *Colorations des extraits et fluorescence en lumière ultraviolette.* — A chaque essai, l'attention est retenue par la différence de coloration des trois types d'extraits : les extraits bruts des plants ramifiés sont brun orangé, alors que ceux des témoins sont vert émeraude.

— Après isolement de la fraction acide, cette différence persiste : après réduction, la liqueur d'extraction des cultures ramifiées est intensément colorée en ocre rouge, tandis que celle des témoins est légèrement brunâtre. De plus, les précipités qu'elle contient sont moins abondants dans ce dernier cas.

— Après chromatographie des trois types d'extraits dans le solvant à base d'alcool isopropylique, les précipités restent localisés au spot initial, alors que les substances colorées forment des traînées brunâtres ou jaunâtres qui migrent jusqu'à une position correspondant à un Rf d'environ 0,6. Autrement dit, la deuxième moitié du chromatogramme est exempte de produits colorants. Ceux-ci, de plus en plus clairs au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la ligne de départ, sont en grande partie de nature phénolique : la benzidine diazotée, réactif des phénols, les colore très intensément en rouge ou en orange.

Seuls des dosages auraient permis de préciser exactement leur nature chimique et de savoir s'ils subissent des modifications de qualité ou de quantité dans les différents extraits : qu'il nous suffise de signaler qu'ils paraissent plus abondants dans les extraits des cultures ramifiées.

— Examinés en lumière ultraviolette, les différents extraits ne présentent pas de fluorescence particulière à l'un d'eux. Cependant, le

spot initial témoin montre une faible fluorescence jaune pâle, alors que ceux des sporophytes ramifiés sont très intensément jaune paille ou jaune verdâtre.

b. *Révélation par le réactif de Salkowski.* — La mise en évidence de l'AIA par le réactif de Salkowski est naturellement gênée par la présence de trainées brunâtres migrant au même Rf. Effectuée sur des extraits de nombreuses cultures témoins (40 à 90), la vaporisation du réactif, suivie d'un léger chauffage, a donné une teinte rose bien visible sur les bords de la tache brune, au même Rf que celui où migre l'AIA synthétique et où s'observe une nette augmentation de l'élongation des coléoptiles utilisés comme test.

La présence d'AIA n'a pas été décelée dans les extraits des plants ramifiés expérimentalement, quel que soit le nombre de ceux-ci : cette absence doit être attribuée aux trop faibles concentrations de cet acide.

Il est donc légitime d'admettre, à la suite de ces observations, que la substance de croissance décelée par le test biologique, migrant au même Rf que l'AIA synthétique, correspond à cette auxine.

2° *Estimation du contenu auxinique basée sur le test Avoine.* — Dans une première série d'expériences, les extraits de cultures de quarante-cinq jours ont été testés. Ont ainsi été traités, en plus des témoins, des sporophytes carencés en calcium (type 1 de premier passage; types 2 et 3 de deuxième passage) et des sporophytes de premier passage cultivés sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper, K. opt ».

Les résultats obtenus traduiront dans ce cas les différences d'activité auxinique existant entre les trois lots de plants.

— Dans une deuxième série d'expériences, les tests ont porté sur des sporophytes de quatorze, vingt et un, vingt-sept et quarante-deux jours, après leur ensemencement sur les différentes solutions salines.

Le but poursuivi ici est de mettre en évidence les variations d'activité auxinique des fractions obtenues et de tenter de relier le contenu hormonal et le début du développement des bourgeons latéraux.

I. CAS DES SPOROPHYTES DE QUARANTE-CINQ JOURS. — La carence en calcium ou l'excès de magnésium d'un milieu par ailleurs optimal provoquant généralement dès le premier passage une chute de croissance, il est évident que le poids final des témoins est plus grand que celui des cultures traitées. *Fallait-il donc utiliser le même nombre de plants (donc d'apex principaux), c'est-à-dire travailler sur des poids différents de matériel végétal, ou au contraire utiliser des poids égaux, ce qui entraînait à traiter des individus en nombres plus ou moins différents?*

Les deux cas ont été étudiés.

a. *Utilisation de poids frais identiques, donc de cultures en nombre inégal.*

Les résultats obtenus sont schématisés par les histogrammes de la figure 62.

Chez les témoins, deux zones d'activité se détachent nettement : une zone correspondant à la position du spot témoin d'AIA ($R_f = 0,30$), et une autre zone, beaucoup plus active, à $R_f 0,05 - 0,13$. Nous appellerons

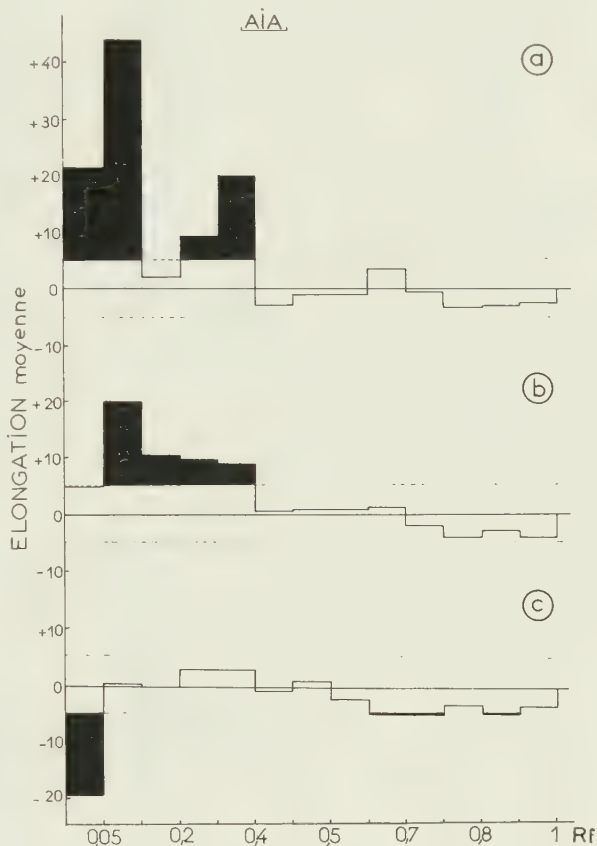
FIG. 62. — Histogrammes de la fraction acide des extraits de sporophytes de quarante-cinq jours (test avoine).

a : 24 cultures témoins.
b : 80 cultures carencées en calcium (types 2 et 3). — c : 143 cultures de 1^{er} passage, sur le milieu à « Ca opt Mg hyper ».

Le poids de matériel frais est égal, pour les trois lots, à 10 g. Avant de subir l'extraction, les tissus frais ont été passés dans l'eau bouillante.

En abscisse : R_f . En ordonnée : pourcentage d'élongation des sections de coléoptiles d'avoine. Le zéro correspond à l'élongation de coléoptiles contrôles cultivés en présence de papier chromatographique prélevé en haut du chromatogramme.

Les deux lignes en pointillé délimitent une zone de variations égales à ± 5 p. 100 du contrôle. On admet que seules sont réelles les valeurs situées en dehors de cette zone (au-dessus : activateur ; au-dessous : inhibiteur).



activateur A la substance provoquant l'augmentation de croissance des coléoptiles à cet endroit.

Chez les cultures carencées en calcium, de deuxième passage (types 2 et 3), ces deux aires d'activité sont présentes mais beaucoup plus faiblement marquées.

Autrement dit, l'activité de quatre-vingts sporophytes ramifiés est inférieure de moitié à celle de vingt-quatre sporophytes témoins.

Chez les sporophytes cultivés sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper/K opt », on note, à la ligne de départ du chromatogramme, une forte inhibition de croissance due vraisemblablement à la grosse quantité de précipités bruns contenus dans l'extrait des cent quarante-trois sporophytes anormaux. Par ailleurs, on n'observe aucune activité.

b. *Utilisation de poids frais différents correspondant à des cultures en nombre égal.* La figure 63 a montre que le contenu auxinique des

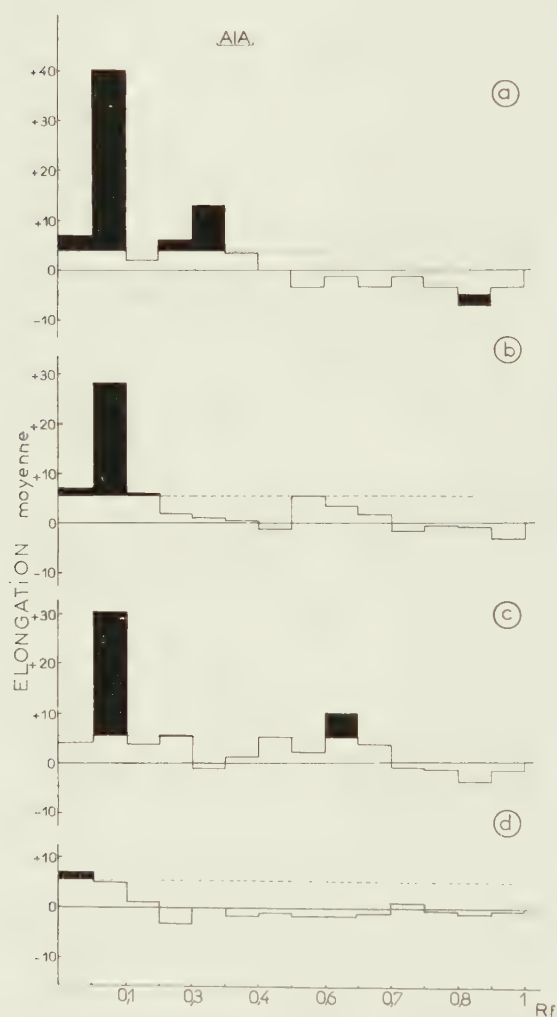


FIG. 63. — Histogrammes de la fraction acide des extraits de sporophytes de 45 jours (test avoine)

a : témoins pesant 5 g. — b : cultures carencées en calcium (type 1), pesant 3 g. — c : cultures carencées en calcium (types 2 et 3), pesant 1,9 g. — d : sporophytes cultivés sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper », pesant 1 g

Le nombre de cultures traitées est égal, pour les 4 lots, à 12

Mêmes légendes que celles de la figure 62

témoins testés dans cet essai ne diffère pas de celui déterminé précédemment : le nombre de cultures utilisées dans les deux expériences est trop peu différent pour que le test y soit sensible. Cet essai nous permet de mettre à nouveau en évidence l'activateur A et l'AIA. On note, en outre, dans la région du front de solvant, la présence d'un faible inhibiteur I, non mentionné précédemment parce que non significatif ; il est de nature peu acide, étant donné son Rf élevé. Bornons-nous à constater pour le moment que sa présence n'est pas constante.

Dans l'extrait des sporophytes de type 1 (fig. 63 b), l'activateur A est moins puissant ou moins abondant — que précédemment, et, à la place où l'on peut s'attendre à trouver l'AIA, il n'y a aucune activité.

La figure 63 c schématise les résultats donnés par les sporophytes des types 2 et 3 : elle montre qu'il n'y a pas de différences appréciables entre les plants plus ou moins ramifiés, si ce n'est la présence d'un léger activateur A, à Rf 0,55, présent dans le premier cas,

mais à un taux qui ne pouvait retenir l'attention. Dans les deux lots d'extraits, on constate l'absence d'AIA. Cette absence (comparer les figures 62 et 63) provient vraisemblablement du trop petit nombre de cultures testées.

De l'ensemble de ces résultats, il faut conclure que les sporophytes carencés en calcium sont moins riches en auxine que les témoins. D'autre part, on peut attribuer la relativement faible activité de A lors de l'extraction d'un grand nombre de cultures des types 2 et 3 à la présence d'émulsions brunes, légèrement inhibitrices, retenues à la ligne de départ du chromatogramme, émulsions beaucoup moins abondantes dans un extrait d'un petit nombre de plants.

— L'histogramme de la figure 63 *d* confirme l'absence d'AIA dans les tissus des sporophytes cultivés sur le milieu à « Ca opt », mais indique la présence de l'activateur A, en très faible proportion il est vrai : l'inhibition constatée dans le cas d'un extrait d'un grand nombre de cultures était bien un artéfact (précipités abondants fortement inhibiteurs).

Ces résultats, plusieurs fois vérifiés et toujours semblables, ont été fournis par des sporophytes tués par un passage à l'eau

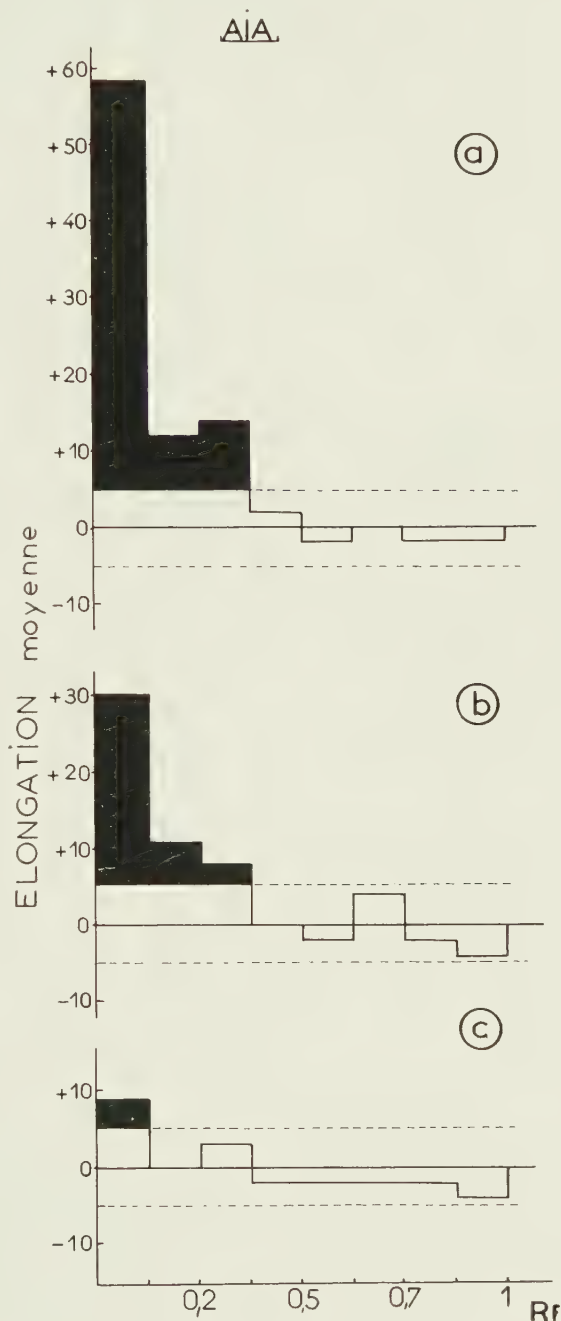


FIG. 64. — Histogrammes de la fraction acide des extraits de sporophytes de 45 jours (test avoine).

a : 60 sporophytes témoins pesant 35 g. — *b* : 108 sporophytes carencés en calcium, pesant 55 g. — *c* : 104 sporophytes cultivés sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper », pesant 22 g.

Le matériel végétal frais a été directement plongé dans l'acétate d'éthyle.

Mêmes légendes que celles de la figure 62.

bouillante précédant l'extraction proprement dite par l'acétate d'éthyle.

La méthode préconisée par KEFFORD [112] ayant été critiquée par

PAVILLARD et BEAUCHAMP [151], nous l'avons comparée à celle qui implique la macération directe du matériel végétal frais dans le solvant choisi. Un plus grand nombre de cultures a été traité suivant cette technique, sans tenir compte de l'égalité de poids ou de nombre des plants.

— La fraction acide des extraits témoins (fig. 64 a) permet de retrouver le puissant activateur A, beaucoup plus actif sur les co-léoptiles parce que le nombre des cultures utilisées est plus grand, et l'AIA dont le taux n'a pas augmenté par rapport aux essais relatés ci-dessus : il faudrait sans doute extraire un beaucoup plus grand nombre de cultures pour que le test Avoine puisse mettre en évidence une nette augmentation d'activité due à l'auxine.

On n'observe pas la présence de l'inhibiteur I, présence vraiment très inconstante.

Pour les plants carencés en calcium, de type 1 (fig. 64 b), les conclusions sont semblables à celles tirées des précédents essais : activité moindre de l'activateur A et de l'AIA, et présence, sans signification il est vrai, de a.

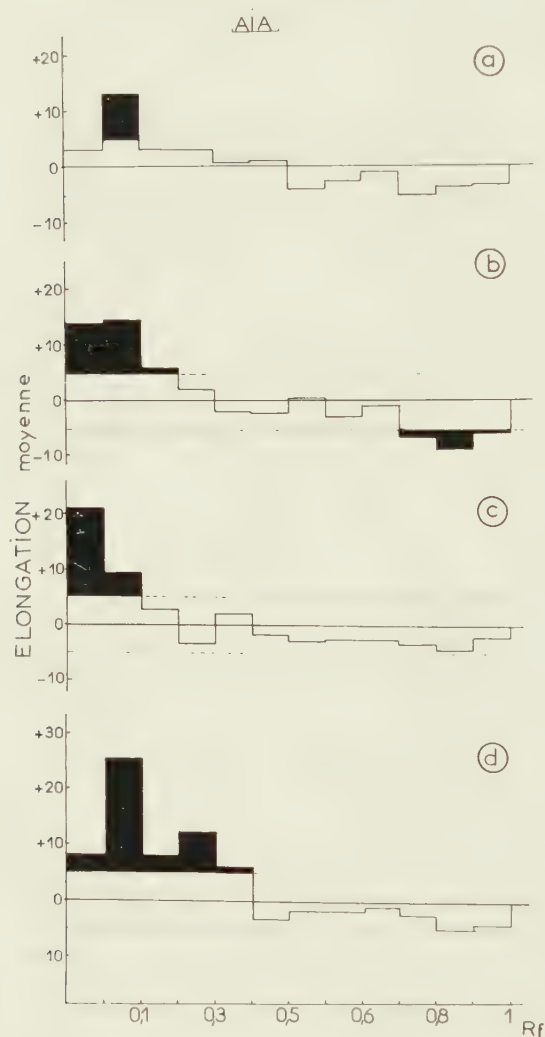


FIG. 65. — Histogrammes de la fraction acide des extraits de 48 sporophytes témoins (test avoine)

a : cultures de 14 jours. — b : cultures de 21 jours
c : cultures de 27 jours. — d : cultures de 42 jours
Avant de subir l'extraction, les tissus frais ont été passés à l'eau bouillante

Mêmes légendes que celles de la figure 62

Dans le dernier extrait étudié (fig. 64 c), on note une aire très faiblement active correspondant à l'activateur A.

Quelle que soit la méthode employée pour leurs préparations, les extraits des cultures ramifiées diffèrent donc de ceux des cultures témoins : ils sont moins riches ou presque totalement dépourvus d'activateur A et d'AIA.

II. INFLUENCE DE L'ÂGE DES SPOROPHYTES SUR LE CONTENU AUXINIQUE. —

Pour chaque test, quarante-huit sporophytes ont été traités quatorze, vingt et un, vingt-sept et quarante-deux jours après leur mise en culture sur les trois milieux expérimentaux.

C'est entre le quatorzième et le vingt et unième jour que s'observe à l'œil nu le grossissement des bourgeons latéraux portés par le rhizome : en effectuant l'étude chromatographique d'extraits de plants en cours de développement, on peut espérer mettre en évidence le ou les facteurs responsables de la ramification.

La comparaison des divers extraits obtenus à partir des trois lots de cultures, schématisée par les histogrammes des figures 65, 66 et 67, montre des différences sensibles de leur contenu actif sur le test Avoine.

— Dans les sporophytes témoins (fig. 65), l'activité de A, décelable dès le quatorzième jour, augmente continuellement au cours du développement. L'AIA, par contre, n'apparaît qu'avec l'état « adulte ». La présence constante mais non significative statistiquement de l'inhibiteur I (sauf au vingt et unième jour) ne peut retenir l'attention.

— Dans les sporophytes carencés en calcium (type 1), l'activité de A (fig. 66) n'augmente pas avec l'âge des cultures. C'est au vingt et unième jour qu'elle est la plus forte et, en particulier, qu'elle est plus forte que

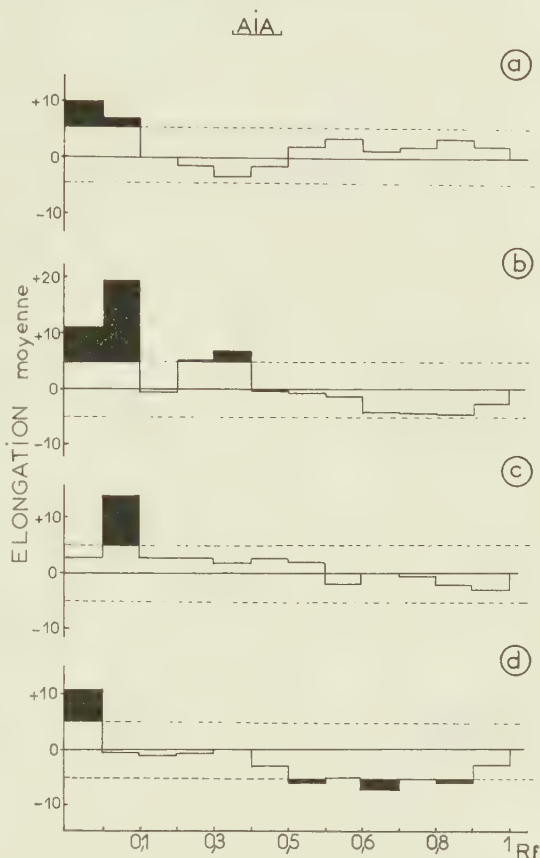


FIG. 66. — Histogrammes de la fraction acide des extraits de 48 sporophytes carencés en calcium (test avoine).

a : cultures de 14 jours. — b : cultures de 21 jours. — c : cultures de 27 jours. — d : cultures de 42 jours.

Avant de subir l'extraction, les tissus frais ont été passés à l'eau bouillante.

Mêmes légendes que la figure 62.

chez les témoins ; à ce moment rappelons-le, la ramification est effectivement constatée par un examen morphologique. A la même époque, on peut déceler la présence d'AIA. Les variations du taux de l'inhibiteur I dont la présence n'est vraiment pas constante (comparer ces résultats avec ceux des précédents essais) ne sont pas liées à l'apparition des troubles étudiés.

— Dans les sporophytes cultivés sur le milieu à « *Ca opt/Mg hyper/K opt* »

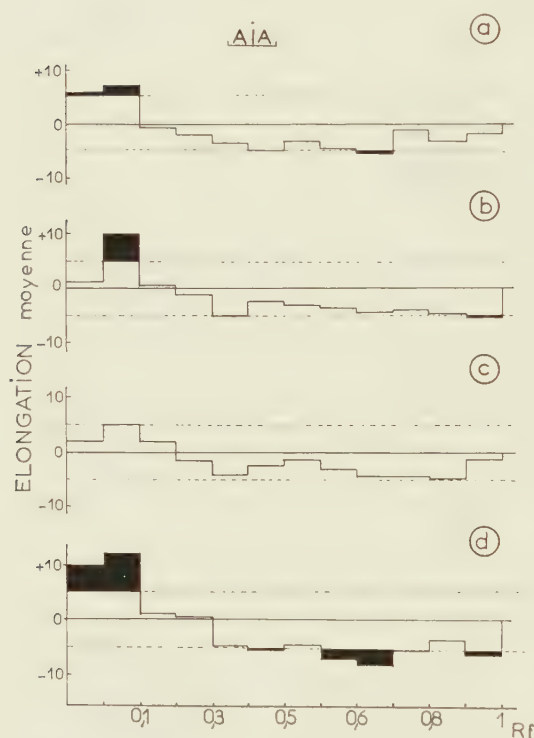


FIG. 67. — Histogrammes de la fraction acide des extraits de 48 sporophytes cultivés sur le milieu à « *Ca opt/Mg hyper* » (test avoine).

a : cultures de 14 jours. — b : cultures de 21 jours. — c : cultures de 27 jours. — d : cultures de 42 jours.

Avant de subir l'extraction, les tissus frais ont été passés à l'eau bouillante.

Mêmes légendes que celles de la figure 62.

(fig. 67), le taux de A, toujours très faible, subit des variations peu marquées qu'il n'est pas possible de relier au développement des bourgeons latéraux. A aucun moment de la croissance, les tissus ne contiennent d'AIA décelable par le test Avoine.

De cette étude, il ressort qu'au cours de la croissance des cultures témoins le taux de l'activateur A augmente progressivement, tandis que l'AIA n'est décelable que dans les tissus de plants très développés. Il est difficile d'expliquer cette brusque apparition au quarante-deuxième jour. Chez les sporophytes plus jeunes, il faut admettre soit que l'AIA est en quantité trop faible pour être sensible au test, soit qu'il est masqué par un inhibiteur qui disparaîtrait avec l'âge (les recherches de PAVILLARD et BEAUCHAMP [23, 150, 151] ont montré que la première hypothèse

n'est pas impossible), soit qu'au cours de la croissance il est sous une forme liée que la méthode employée ici ne peut détecter puisqu'elle ne met en évidence que les auxines dites libres. Il est impossible de choisir l'une plutôt que l'autre de ces hypothèses, mais il est intéressant de noter que l'AIA n'est présent que lorsque l'activateur A a atteint son maximum.

La ramification des sporophytes est liée sans doute à deux processus

hormonaux différents. Les cultures carencées en calcium, c'est-à-dire celles qui souffrent le moins, au premier passage, de leurs conditions nutritives, sont relativement riches en A et en AIA au moment où débute le développement des bourgeons ; là encore, il est possible d'établir un lien entre les deux promoteurs de croissance : l'AIA n'est décelable que lorsque A est à son taux le plus fort. Ensuite, les effets de la carence s'accroissant, leur quantité diminue notablement et, au quarante-deuxième jour, l'activité de l'AIA est nulle en même temps que l'activateur A est à son niveau le plus bas. Comme pour les témoins, il existe sans doute une relation entre les deux corps, relation qui n'apparaît pas au même moment du développement de la plante puisqu'elle est beaucoup plus précoce en cas de ramification qu'en cas de croissance normale.

Dans les tissus des sporophytes qui subissent le plus fortement les conditions défectueuses qui leur sont offertes, il est impossible d'établir un lien entre formation des axes latéraux et variations du taux de l'activateur A, puisqu'il est toujours en trop faible quantité, ni d'établir les liens décelés précédemment, puisque l'AIA est toujours absent.

3° Estimation du contenu auxinique basée sur le test « Marsilea ». — Dans un premier essai, les aires des chromatogrammes de la fraction acide des extraits ont été déposées dans un tube de culture contenant 50 cm³ de milieu de référence.

— Dans une deuxième série d'expériences, la quantité de solution nutritive a été réduite à 35 cm³.

Rappelons que, dans ce test, la mise en évidence de substances actives est basée sur l'augmentation ou la diminution d'au moins 20 p. 100 du poids des sporophytes « test » par rapport à celui des sporophytes « contrôles » cultivés en présence de papier chromatographique prélevé en haut du chromatogramme.

I. PREMIER ESSAI. — Les histogrammes de la figure 68 résument les résultats obtenus et montrent que :

— L'activateur A, mis en évidence en plus ou moins grande quantité par le test Avoine dans les tissus de toutes les cultures, n'est décelé par le test *Marsilea* que chez les témoins.

— Le test n'est pas sensible à l'AIA, si celui-ci est présent.

Un tel résultat ne doit pas nous étonner : nous avons pu vérifier que le *Marsilea* ne réagissait qu'à des doses non physiologiques d'AIA synthétique : seules les fortes concentrations de 1 ou 10 mg/litre ajoutées au milieu nutritif provoquent une chute de croissance sensible, accompagnée de modifications morphologiques légères.

— Il existe un très puissant inhibiteur I' au front de solvant, commun à tous les extraits. S'il est identique à l'inhibiteur I mis en évidence par le test Avoine, sa présence est ici constante alors que, dans les premiers essais, elle est fort épisodique.

Les cultures de quarante-cinq jours sont toutes morphologiquement normales, sauf aux niveaux des aires inhibitrices I' : petites, brunâtres ; leurs racines et leurs feuilles sont très sous-développées. La formation des

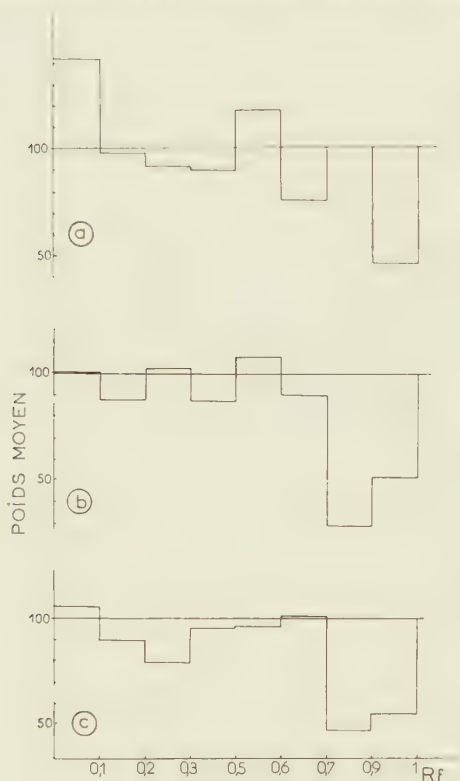


FIG. 68. — Histogrammes de la fraction acide des extraits de sporophytes de 45 jours (test *Marsilea*).

a : 60 sporophytes témoins pesant 35 g. — b : 108 sporophytes carencés en calcium (type 1), pesant 55 g. — c : 104 sporophytes cultivés sur le milieu à « Ca opt. Mg hyper », pesant 22 g.

Chaque aire de papier chromatographique a été déposée dans 50 cm³ de milieu témoin.

En abscisse : Rf. En ordonnée : pourcentage d'accroissement pondéral des cultures de 45 jours. Le « 100 » correspond au poids final moyen de sporophytes contrôles cultivés en présence de papier chromatographique prélevé en haut du chromatogramme. Une diminution ou une augmentation du poids des cultures, égale à 20 p. 100, traduit la présence d'une substance active sur le test.

feuilles épanouies se trouve bloquée. Les bourgeons latéraux sont anormalement gros, mais n'ont pas donné de feuilles secondaires.

II. DEUXIÈME ESSAI. — La quantité de milieu nutritif a été ramenée de 50 cm³ à 35 cm³. On vient de voir, en effet, que l'inhibiteur I' décelé au front de solvant et commun à tous les extraits est très toxique pour le sporophyte de *Marsilea*. On pouvait donc se demander si, en réduisant la quantité de milieu d'élution, on ne pouvait accroître cette toxicité et provoquer, en conséquence, le grossissement des bourgeons latéraux des sporophytes servant de test. Une telle démarche ne permettait pas cependant de savoir si cet inhibiteur est caractéristique des extraits ou s'il n'est qu'un artéfact dû aux impuretés des produits employés au cours des étapes nécessitées par la chromatographie, impuretés qui se condenseraient au front de solvant et seraient nuisibles au développement normal de la plante.

Pour répondre à cette dernière question, trois groupes de huit sporophytes « contrôles » ont été cultivés :

1^{er} groupe : explantats cultivés sans papier chromatographique.

2^e groupe : explantats mis en présence de papier chromatographique prélevé en haut du chromatogramme : ce papier a donc été uniquement en contact avec le solvant de chromatographie.

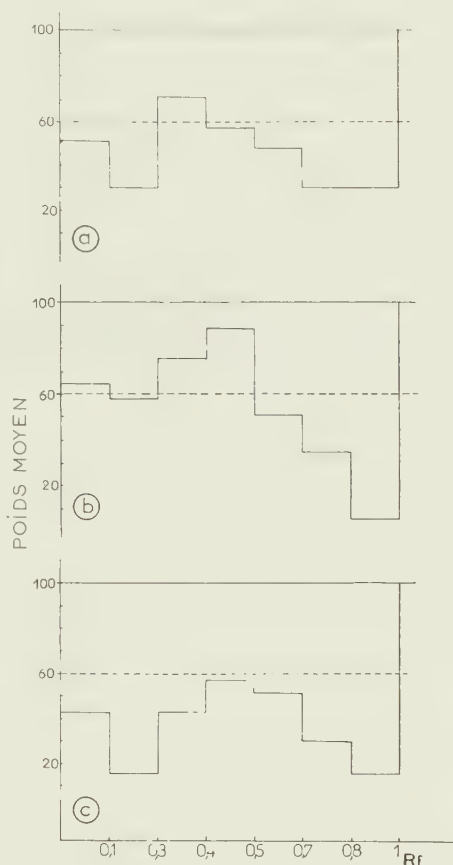
3^e groupe : explantats cultivés en présence de papier chromatographique prélevé au front de solvant, sur une bande dont le spot initial

FIG. 69. — Histogrammes de la fraction acide des extraits de sporophytes de 45 jours (test *Marsilea*).

a : 80 sporophytes témoins. — b : 80 sporophytes carencés en calcium (type I). — c : 80 sporophytes cultivés sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper ».

Chaque aire de papier chromatographique a été déposée dans 35 cm³ de milieu témoin.

En abscisse : *R_f*. En ordonnée : pourcentage d'accroissement pondéral des cultures de 45 jours. La ligne en trait plein (100) correspond au poids final moyen de sporophytes contrôles cultivés en présence de papier chromatographique prélevé en haut du chromatogramme ; la ligne en pointillé (60), au poids final moyen de sporophytes cultivés en présence de papier chromatographique prélevé au front de solvant.



a reçu 0,5 cm³ d'acétate d'éthyle : le carré de papier a donc été en contact avec le solvant d'extraction et le solvant de chromatographie.

Les résultats sont les suivants :

— Le papier pris en haut du chromatogramme ne modifie pas la croissance des sporophytes (comparaison des données numériques fournies par les plants des deux premiers groupes). Le solvant de chromatographie, ni le papier, ne contiennent donc de produits toxiques pour le *Marsilea*. Les sporophytes de ces deux groupes peuvent donc être pris comme cultures de référence.

Prélevé au front de solvant, le papier provoque une chute de croissance de 35 à 40 p. 100 : les sporophytes, petits, présentent cependant un aspect presque normal : les bourgeons latéraux ont leur taille habituelle. Les deux solvants contiennent donc des impuretés nuisibles au *Marsilea*, substances qui se trouvent groupées au front de solvant.

Dans ces conditions, la présence d'un inhibiteur I' caractéristique des extraits témoins ou des cultures ramifiées ne pourra être détectée, en



FIG. 70. — Aspect morphologique d'un sporophyte de *M. d.* cultivé en présence de l'inhibiteur I' mis en évidence par le test *Marsilea* ($\times 2$)

La culture est chétive. Ses bourgeons latéraux *BL* sont anormalement gros et ont produit de jeunes feuilles, bien visibles sur la figure dans la région proche de l'explantat *Ex*

toute sûreté, par le test que s'il provoque une diminution de croissance de l'ordre de 60 p. 100.

L'analyse des histogrammes fournis par les trois extraits (fig. 69) montre une action inhibitrice à tous les niveaux, particulièrement marquée à la ligne de départ et au front de solvant. Aussi n'est-il pas possible de mettre en évidence l'activateur A des tissus témoins décelé dans le précédent essai. Il faut cependant noter que, dans la région correspondant aux spots initiaux, les cultures faiblement développées présentent toutes des bourgeons latéraux normaux. Leur nanisme peut être dû aux matières colorantes brunes qui ont diffusé dans le milieu nutritif et l'ont, en conséquence, rendu peu transparent.

L'inhibiteur I', plus concentré, est aussi plus toxique. Il occasionne une chute de l'accroissement pondéral, beaucoup plus forte qu'au cours du précédent essai, et supérieure à 60 p. 100 si l'on tient compte des

précisions apportées au cours de celui-ci. A son niveau, les sporophytes sont morphologiquement anormaux (fig. 70) : ils sont tous ramifiés ; les ramifications très courtes portent des feuilles petites et peu chlorophylliennes. Elles sont localisées dans la région proche de l'explantat.

Il y a donc, au front de solvant, des corps très toxiques pour le *Marsilea*, corps qui provoquent sa ramification et sont communs à tous les extraits. Leur présence et leurs effets ne peuvent être attribués aux impuretés des produits utilisés au cours des différentes étapes que nécessite la méthode employée. Ces substances inhibitrices sont des constituants normaux des cultures. Le test *Marsilea*, beaucoup plus sensible aux inhibiteurs que le test Avoine, a permis de les mettre en évidence. Il ne nous a pas été possible de déterminer leur nature chimique : leur Rf élevé indique qu'ils sont peu acides. Les différentes réactions chimiques effectuées ont montré, par ailleurs, qu'ils ne sont pas de nature phénolique, glucidique et aminée. Nous pourrions ajouter indolique, mais l'on sait que la mise en évidence des noyaux indol est délicate et sujette à caution [140].

EN RÉSUMÉ, seul le test Avoine s'est révélé efficace pour déterminer les différences existant dans le contenu « auxinique » des sporophytes témoins à bourgeons inhibés et des sporophytes ramifiés. Il a permis de mettre en évidence, dans la fraction acide des extraits, deux substances actives, l'activateur A et l'AIA, toutes deux en quantité toujours plus grande chez les témoins. Ainsi, *la ramification des cultures est liée à la diminution de l'AIA — diminution pouvant aller jusqu'à la disparition — et à la diminution du taux de l'activateur A.*

Le test *Marsilea* n'a pas confirmé ces résultats. Dans un premier essai, cependant, il a permis de mettre en évidence l'activateur A dans les extraits témoins. Il est insensible à la présence — ou à l'absence — de l'AIA. L'inhibiteur qu'il détecte, commun à tous les plants, n'est pas caractéristique des cultures témoins : la latence de leurs bourgeons latéraux ne peut lui être attribuée.

La nature chimique de l'activateur A, ni celle de l'inhibiteur I' n'ont pu être précisées.

B. — ESSAIS DE CONTROLE DES RÉSULTATS OBTENUS.

Parmi les résultats obtenus précédemment, seuls ceux concernant le rôle de l'AIA peuvent être vérifiés expérimentalement. Deux voies ont été suivies à cet égard : l'une a consisté à faire agir l'auxine synthétique sur des cultures ramifiées, l'autre à modifier par des substances appropriées l'AIA endogène des cultures témoins de manière à provoquer leur ramification.

1^o Action de l'AIA synthétique sur les sporophytes ramifiés. — Nous venons de voir que l'AIA se trouve en quantité réduite ou même est

absente des tissus des sporophytes ramifiés. Il est donc légitime de supposer qu'ajouté artificiellement aux milieux de culture il empêchera le développement des bourgeons latéraux.

Les observations ont porté sur douze sporophytes cultivés sur les deux milieux expérimentaux additionnés de 0,1 et 1 mg litre d'AIA.

I. RÉSULTATS FOURNIS PAR LES SPOROPHYTES CARENCÉS EN CALCIUM.

— *A la plus forte concentration*, l'action de l'AIA sur les sporophytes de premier passage est nette : les bourgeons latéraux sont moins développés que ceux décrits pour le type 1. Les feuilles qu'ils forment restent à l'état d'ébauches. Les feuilles principales épanouies sont plus nombreuses. Mais l'AIA est toxique s'il est fourni de façon durable. A la fin du troisième passage, les cultures sont petites; leur rhizome reste court; les racines sont relativement longues alors que les feuilles, aux formes contournées, sont chétives et souvent bifides. Cependant, les bourgeons latéraux ne forment pas plus d'une à deux feuilles, de taille réduite (fig. 71 *a*).

A la plus faible concentration, l'AIA n'a pas d'action sur les cultures de premier passage : elles sont toutes du type 1.

C'est au cours du deuxième et surtout du troisième passage que les résultats sont nets :

— En absence d'auxine, les sporophytes carencés en calcium qui survivent au cours du troisième passage (quatre sur douze) sont tous du type 3.

— En sa présence, la mortalité n'affecte que le quart des cultures. Les neuf survivantes (fig. 71 *b*) sont peu nécrosées et portent des racines longues et blanchâtres; leurs feuilles sont souvent épanouies. Une anomalie cependant est à signaler : les deux rhizomes issus du développement des deux bourgeons de l'explantat s'allongent également. La ramification est intense dans la région basale de la culture et lui confère son aspect touffu habituel. Au niveau des régions médianes et apicales, les bourgeons latéraux ne sont pas plus développés que ceux des sporophytes de type 1 qui, rappelons-le, sont déjà rares à la fin du deuxième passage lorsque l'hormone est absente du milieu nutritif.

Les explantats prélevés sur de telles cultures survivent à un quatrième repiquage. Sur douze sporophytes de quarante-cinq jours observés, quatre sont morts, deux sont encore du type 1, deux du type 2 et quatre du type 3. Ces derniers (fig. 71 *c*) appellent les remarques suivantes : bien que d'aspect très touffu, les sporophytes présentent encore, dans leur région apicale, un rhizome relativement peu ramifié, jamais observé en absence d'auxine.

A la fin du cinquième passage, quatre cultures sont mortes, une est du type 1 (ses bourgeons latéraux sont à peine plus gros que ceux des plants normaux), quatre sont du type 2 et trois du type 3.

L'action frénatrice de l'AIA sur la ramification du rhizome est nette : en sa présence, les cultures carencées en calcium sont moins touffues que

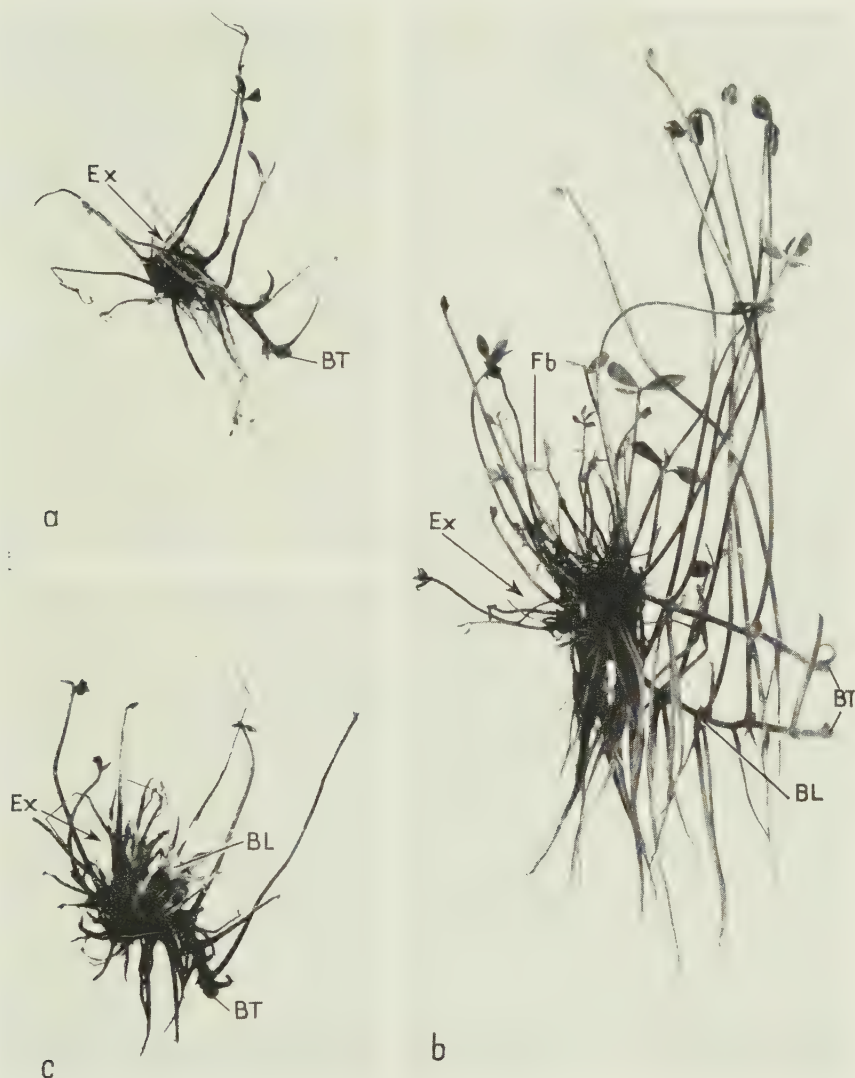


FIG. 71. — Action de l'AIA synthétique sur le développement de sporophyte de *M. d.* carencé en calcium ($\times 2$).

a : sporophyte de 3^e passage cultivé en présence de 1 mg/l.

On remarquera que la culture reste très touffue dans sa partie basale alors que, dans ses portions médiane et apicale, les bourgeons latéraux sont peu développés : les feuilles qu'ils forment sont peu nombreuses.

b : sporophyte de 3^e passage cultivé en présence de 0,1 mg/l.

On remarquera que la culture reste très touffue dans sa partie basale alors que, dans ses portions médiane et apicale, les bourgeons latéraux sont peu développés : les feuilles qu'ils forment sont peu nombreuses.

c : sporophyte de 4^e passage cultivé en présence de 0,1 mg/l.

La culture est très ramifiée. De la « boule » proche de l'explantat, émerge une portion de rhizome rectiligne, à nœuds relativement espacés.

Ex, explantat ; *BT*, bourgeon terminal ; *BL*, bourgeon latéral ; *Fb*, feuille bifide.

lorsqu'il est absent du milieu. Cependant, l'inhibition des bourgeons latéraux n'est pas totale : l'AIA diminue le buissonnement sans l'empêcher complètement. Dans tous les cas observés, les bourgeons sont plus développés que ceux des témoins. Il permet, en outre, la survie des sporophytes au-delà du cinquième passage alors que, sans lui, leur mort survient plus précocement. Cette prolongation de vie n'est qu'une conséquence de l'action de l'hormone, mais prouve nettement, quoique indirectement, que les tissus carencés en sont dépourvus ou déficients.

Ces observations vérifient donc les résultats donnés par l'analyse chromatographique.

II. RÉSULTATS FOURNIS PAR LES SPOROPHYTES CULTIVÉS SUR LE MILIEU A « Ca OPT/Mg HYPER/K OPT ». — Les observations ont conduit à des conclusions tout à fait similaires : tous les sporophytes sont vivants à la fin du quatrième passage sur le milieu pourvu de la plus faible concentration d'AIA, la moitié seulement sur celui qui contient 1 mg, alors que, sans hormone synthétique, ils ne survivent pas à un troisième repiquage.

Touffu dans sa région basale, le rhizome porte des nœuds espacés dans ses autres parties et est peu ou très peu ramifié. Mais, là encore, le blocage du développement des bourgeons latéraux n'est jamais total.

De l'ensemble de ces observations, il faut conclure que l'AIA synthétique ajouté à des milieux qui provoquent la ramification des sporophytes du *Marsilea* diminue très nettement l'intensité de ce buissonnement anormal. Il ne régit pas seul, cependant, l'inhibition des bourgeons portés par le rhizome. D'autres facteurs doivent entrer en jeu. Parmi ceux-ci, il est possible que l'activateur A, décelé par chromatographie, la contrôle, à moins qu'il ne faille envisager d'autres processus de blocage. Ce sont eux que nous essaierons maintenant de mettre en évidence.

2^o Action des inhibiteurs ou antagonistes de l'AIA sur les sporophytes témoins. — Est-il possible de provoquer expérimentalement le développement des bourgeons latéraux portés par les sporophytes témoins ?

On sait maintenant (recherches chromatographiques) que l'inhibition des bourgeons placés sous l'apex est, en partie, sous la dépendance de l'AIA : si l'auxine est absente ou en quantité insuffisante, le rhizome se ramifie. Si son taux est artificiellement augmenté, le buissonnement est moins intense. Il doit alors être possible de provoquer le développement des bourgeons naturellement latents des témoins en agissant expérimentalement sur leur contenu en auxine, à l'aide de substances connues pour s'opposer à l'action de l'hormone.

Parmi les composés connus pour jouer ce rôle d'antagonistes ou d'inhibiteurs d'auxine [1, 2, 20, 43, 77, 80, 121, 122, 132, 142, 154, 155, 162], nous avons choisi l'acide 2-3-5-triiodobenzoïque (ATIB), l'hydrazide maléique (H. M.) et la coumarine.

Cultivés pendant trois passages consécutifs sur le milieu de référence

pourvu de l'un de ces trois corps, à la concentration de 1, 5 ou 10 mg/litre, les sporophytes de quarante-cinq jours présentent tous des *bourgeons normaux*. Seule leur croissance est plus ou moins affectée : peu différente en présence de coumarine, elle est fortement diminuée par l'H. M. et l'ATIB. La dominance apicale n'est touchée par aucune de ces trois substances.

L'échec que nous avons enregistré (1) peut sans doute être attribué à deux causes différentes : — les composés chimiques employés n'agissent pas directement sur le contenu en AIA des sporophytes et ne sont pas, en réalité, des antagonistes de l'hormone, mais des régulateurs de croissance — dans nos essais des inhibiteurs plus ou moins efficaces. Divers auteurs ont été amenés à formuler une telle hypothèse (BURSTOM [46], BENTLEY [30], KULESCHA [117], AUDUS et THRESH [20]). — L'inhibition des bourgeons est sous la dépendance d'autres facteurs que l'AIA — activateur A — : les inhibiteurs d'AIA expérimentés peuvent alors ne pas perturber les interactions qui existent entre ces facteurs et l'auxine naturelle.

C. — ROLE DES FEUILLES ET DES RACINES SUR L'INHIBITION CORRÉLATIVE DES BOURGEONS.

L'influence réciproque des organes les uns sur les autres est connue depuis longtemps (GEBEL [86]). Des études récentes ont montré le rôle joué par les feuilles et les racines sur l'inhibition des bourgeons de Végétaux herbacés (CHAMPAGNAT [52-53], CHAMPAGNAT et DALZON [57], CHAMPAGNAT et AFFRAIX [58], COURDUREUX [61], DOSTAL [67], LIBBERT [124-125], RÉMY et ALLARY [158], SÖDING [179], THIMANN [191, 192, 194]), ou de Végétaux ligneux (ALLARY [3, 4], CHAMPAGNAT [54, 55, 56], THIMANN [193]).

Elles ont toutes conclu que l'auxine produite par le bourgeon terminal n'est pas toute-puissante et ne peut seule expliquer l'arrêt du développement des bourgeons placés sous l'apex.

Il nous a paru primordial de rechercher si de telles corrélations, toujours démontrées chez des Végétaux supérieurs, pouvaient exister chez les Fougères. Leur cas, en effet, n'a jamais été envisagé.

Les essais ont porté sur des sporophytes témoins traités dans des conditions expérimentales déterminées et soumis à une observation vingt jours après le début du traitement.

1^o Expériences sur nœuds isolés. — Chaque explantat repiqué sur le milieu témoin comprend un seul nœud.

a. Le nœud porte sa feuille et ses racines intactes. — Le bourgeon latéral présent au nœud se développe normalement en un sporophyte qui ne diffère pas de ceux habituellement observés.

(1) LÉOPOLD [121] a, bien avant nous, enregistré un échec semblable.

b. *Le nœud porte sa feuille intacte ; ses racines ont été excisées.* — Comme dans le cas précédent, on observe le développement normal du bourgeon.

c. *Le nœud porte ses racines intactes ; sa feuille a été excisée.* — Même résultat : on constate le développement normal du bourgeon.

Le bourgeon latéral, inhibé au moment de sa mise en culture, se développe normalement lorsqu'il n'est plus soumis à l'influence du bourgeon terminal. Les feuilles et les racines auxquelles il est associé n'exercent alors aucune influence sur sa croissance ultérieure.

2^o Expériences sur un ensemble de nœuds. — I. SPOROPHYTE ENTIER PRIVÉ DE SON BOURGEON TERMINAL. — Après avoir excisé l'apex (comprenant les jeunes primordiums et ébauches foliaires non visibles à l'œil nu) d'un sporophyte de quarante-cinq jours, on procède à la transplantation du plant ainsi préparé sur milieu témoin : le bourgeon latéral le plus proche du point d'excision se développe en une portion de rhizome tout à fait normale, tandis que les autres méristèmes latéraux, plus éloignés, ne montrent aucun signe d'activité.

C'est le bourgeon terminal qui, dans ce cas, règle l'inhibition des bourgeons placés sous lui. S'il est supprimé, c'est le bourgeon latéral le plus proche de lui qui se développe et devient à son tour dominant.

II. SPOROPHYTE ENTIER COMPRENANT SON BOURGEON TERMINAL. — Les excisions pratiquées sur les sporophytes avant leur transplantation sur milieu témoin sont du même type que celles relatées au paragraphe 1. Dans ce groupe d'expériences, il a été procédé à la mensuration des feuilles formées par les bourgeons latéraux et développées après la transplantation. L'élongation moyenne de leurs pétioles sera rapportée *soit* au nombre de nœuds préexistants sur le rhizome traité (qu'ils portent ou non de telles feuilles), *soit* au nombre des nœuds qui comportent un bourgeon latéral entrant en activité après traitement. La comparaison des valeurs ainsi obtenues (tableau XL) permettra d'apporter les précisions souhaitables à la compréhension des phénomènes observés.

FIG. 72. — Action des feuilles et des racines sur le développement des bourgeons auxquels elles sont associées ($\times 2$).

a : feuilles intactes, racines sectionnées. — *b* : racines intactes, feuilles sectionnées. — *c* : feuilles et racines sectionnées.

Les portions de rhizome formées après transplantation ont été supprimées ; la direction dans laquelle elles se sont développées est indiquée par une flèche marquée *BT*. Les flèches en pointillé marquent les feuilles et les racines issues du développement des bourgeons latéraux, 20 jours après qu'auraient été effectuées les différentes excisions.



TABLEAU XL. — INFLUENCE DES DIVERS ORGANES (feuilles et racines) SUR L'ÉLONGATION MOYENNE DES FEUILLES SECONDAIRES.

Les sporophytes comportent leur bourgeon terminal.

TRAITEMENT.	ÉLONGATION MOYENNE DES FEUILLES SECONDAIRES.	
	Pour l'ensemble des nœuds.	Par bourgeon développé.
1 ^{er} cas : Feuilles intactes, racines excisées...	0,6	3,5
2 ^e cas : Feuilles excisées, racines intactes...	6,7	7,1
3 ^e cas : Feuilles et racines coupées	4,1	5,2

PREMIER CAS : *feuilles intactes, racines sectionnées* (fig. 72 a).

La portion de rhizome, formée après transplantation sur milieu témoin, provient naturellement du bourgeon terminal intact : elle est tout à fait normale. Par contre, quelques-uns des bourgeons latéraux portés par le rhizome primitif entrent en activité. Ils forment une feuille et une racine courtes, mais bien visibles.

L'élongation moyenne des feuilles « secondaires » est égale à 0,6 ou à 3,5 cm, selon qu'elle est rapportée à l'ensemble des nœuds préexistants ou à chacun des nœuds entrés en activité.

Ces données numériques fort différentes indiquent que les feuilles développées après le sectionnement des racines ont subi un allongement appréciable à *certain nœuds du rhizome, mais que les bourgeons latéraux « actifs » dont elles proviennent sont fort peu nombreux.*

Lorsque le bourgeon terminal est intact, les racines les plus âgées contribuent à inhiber le développement des bourgeons latéraux placés au même niveau qu'elles.

Notons que ces racines sont normalement les plus courtes et celles qui montrent le plus rapidement des signes de sénescence. Les racines plus jeunes, c'est-à-dire les plus longues et celles qui gardent le plus longtemps leur intégrité, ne jouent pas de rôle inhibiteur sur leurs propres bourgeons puisqu'ils restent latents même lorsqu'elles sont absentes.

DEUXIÈME CAS : *racines intactes; feuilles sectionnées* (fig. 72 b).

Comme dans le cas précédent, le rhizome néo-formé issu de l'activité du méristème terminal est normal. Au niveau de l'« ancien » rhizome, on

observe la présence d'une feuille secondaire au niveau de *chacun des bourgeons latéraux*. L'élongation moyenne des pétioles par nœud développé est égale à 7,1 cm (soit deux fois plus que dans le premier cas) ou à 6,7 cm si l'on se réfère à l'ensemble des nœuds préexistants (soit dix fois plus).

La figure 72 *b* montre, en outre, que les feuilles les plus développées (tant du point de vue de leurs pétioles que de leurs folioles) sont localisées dans la région la plus jeune du sporophyte d'origine.

En présence d'un apex principal intact, les feuilles jouent un rôle important dans l'inhibition de leur bourgeon. L'inhibition est d'autant plus forte que la feuille est plus jeune.

TROISIÈME CAS : racines et feuilles excisées (fig. 72 *c*).

Au niveau de tous les nœuds présents avant le traitement, les bourgeons latéraux entrent en activité : ils forment une ou deux feuilles dont la longueur moyenne est sensiblement la même, qu'on la rapporte à l'ensemble des nœuds ou à chaque nœud.

TABLEAU XLI. — IMPORTANCE DU DÉVELOPPEMENT DES BOURGEONS LATÉRAUX (basée sur la longueur moyenne en millimètres), DES FEUILLES QU'ILS FORMENT, SUIVANT LEUR POSITION SUR LE RHIZOME FORMÉ AVANT LE TRAITEMENT.

TRAITEMENT.	RÉGION BASALE.	RÉGIONS MÉDIANE ET APICALE.
Sans feuilles, sans racines	6,2	3,1
Sans racines, avec feuilles	2,3	0
Avec racines, sans feuilles	5,6	8,4

L'élongation est d'autant plus forte que les nœuds sont plus éloignés de l'apex primitif. Il y a, dans ce cas, action conjuguée des feuilles et des racines sur le bourgeon. Cette action n'est pas la même si l'on envisage la partie la plus âgée ou la plus jeune du rhizome formé avant excision.

De l'examen du tableau XLI, il ressort que :

1° Dans la région basale, l'inhibition faible exercée par les racines est renforcée par l'inhibition due aux feuilles : dans ce cas, l'inhibition provoquée par les deux types d'organes sur le bourgeon auquel elles sont associées est la résultante de leurs deux actions.

2^o Dans les régions médiane et apicale, les racines qui n'ont aucun pouvoir vis-à-vis de leur bourgeon contribuent à diminuer le fort pouvoir inhibiteur des feuilles. En effet, à ce niveau, l'ablation des racines ne provoque aucun effet (premier cas), alors que l'excision des feuilles aboutit au développement intense des bourgeons (deuxième cas), et la résultante de ces deux traitements (troisième cas) provoque un développement d'amplitude moyenne.

III. SPOROPHYTE ENTIER PRIVÉ DE SON APEX ET DE L'UN OU DE L'AUTRE TYPE D'ORGANES. — Les trois cas envisagés précédemment, alors que le sporophyte présentait un apex intact, ont été étudiés après excision du bourgeon terminal. Les résultats obtenus sont tout à fait semblables : une telle similitude ne peut surprendre, puisque l'on sait (cf. 2 a) que, aussitôt après ablation, le sporophyte continue sa croissance normale par développement du bourgeon latéral le plus proche du point d'excision, bourgeon rapidement dominant.

EN RÉSUMÉ, les feuilles et les racines, à des degrés divers, ne jouent un rôle inhibiteur que lorsque la plante est laissée sous l'influence du bourgeon terminal (ou de celui qui le remplace immédiatement en cas d'ablation). C'est donc à celui-ci que revient le rôle primordial dans l'inhibition des bourgeons latéraux puisque, dans les deux cas où ne s'exerce pas son action, ni les feuilles, ni les racines ne sont capables d'inhiber, *séparément ou conjointement*, le bourgeon placé au même nœud qu'elles.

Autrement dit, *le faible mais réel pouvoir inhibiteur des organes foliaires ou radiculaires s'ajoute au pouvoir inhibiteur fort de l'apex principal* (et des ébauches qu'il comprend).

Cette conclusion est favorable à l'hypothèse formulée par SNOW [175, 176, 177] qui suppose que l'auxine formée à l'apex n'agit pas directement pour inhiber les bourgeons sous-jacents, mais indirectement, en déclenchant un mécanisme spécial dont il ne précise pas la nature. De nos observations, il ressort que cette action proviendrait des feuilles et des racines.

D. — ESSAI D'INTERPRÉTATION DE LA RAMIFICATION EXPÉRIMENTALE DU « MARSILEA ».

Le déterminisme probable de la ramification des sporophytes carencés en calcium ou cultivés sur le milieu à « Ca opt Mg hyper/K opt » peut, à la lumière des résultats obtenus, être établi.

Avant d'exposer les conclusions auxquelles nous avons abouti, il n'est pas inutile de rappeler que, dans les deux cas cités, le développement des bourgeons latéraux est d'autant plus important qu'il s'effectue loin de l'apex terminal (cf. les figures 14, 53 et 72 c).

1^o *Le bourgeon terminal affaibli par la nutrition défavorable, pauvre ou très pauvre en auxine, n'est plus capable d'inhiber le développement des bourgeons placés sous lui.* — L'hormone qu'il sécrète, circulant du sommet vers l'explantat, en direction basipète, est insuffisante pour bloquer, directement ou indirectement, la croissance des méristèmes latéraux : se raréfiant au fur et à mesure qu'elle migre vers la base des plants, elle est encore en quantité suffisante pour inhiber les bourgeons proches de l'apex et de plus en plus inefficace sur ceux qui en sont le plus éloignés. C'est pourquoi les ramifications les plus longues sont toujours les plus proches de l'explantat.

2^o *A cette déficience en auxine s'ajoute une diminution du pouvoir inhibiteur des feuilles et des racines.* — Les observations ont toujours montré, dans les deux cas étudiés, un très net sous-développement des systèmes foliaire et racinaire. Il est, à cet égard, troublant de constater la coïncidence qui existe entre le mode de croissance des ramifications des cultures expérimentales et celui que nous avons décrit chez les sporophytes témoins privés de feuilles et de racines : les rhizomes latéraux les plus longs sont les plus éloignés de l'apex. Il est légitime de penser que ni les feuilles, ni les racines, ne sont aptes à fournir les facteurs qui renforcent l'inhibition corrélative des bourgeons laissés sous l'influence d'un apex plus ou moins lésé.

EN RÉSUMÉ, chez le sporophyte du *Marsilea* témoin, l'inhibition des bourgeons latéraux est due à la présence du bourgeon terminal. Le pouvoir qu'il exerce est renforcé par celui des feuilles et des racines qui n'agissent cependant que lorsque l'apex est intact.

Chez les sporophytes expérimentaux, la ramification s'explique par une diminution du pouvoir inhibiteur des feuilles et des racines, toujours anormales, et suppose que le méristème principal est lésé : c'est ce dernier point que nous essaierons maintenant de vérifier.

2^o *Fonctionnement et structure des points végétatifs des sporophytes témoins et des sporophytes ramifiés.*

L'étude a porté sur le fonctionnement et la structure des bourgeons *principaux* et *latéraux* prélevés sur des plants témoins ou ramifiés. Quelques observations cytochimiques, faites parallèlement, ont permis de mettre en évidence les modifications touchant le métabolisme cellulaire.

L'ensemble des résultats obtenus nous a conduit à préciser certaines de nos conclusions antérieures et à valider l'hypothèse formulée précédemment : la levée de la dominance apicale est explicable *histologiquement* par la présence de lésions au niveau des points végétatifs terminaux.

Variations du pouvoir organogène des apex principaux et latéraux en fonction du milieu nutritif.

L'étude a été limitée à la formation des feuilles (1). Le nombre des feuilles formées en quarante-cinq jours par les bourgeons terminaux et latéraux des témoins est-il très différent de celui des plants ramifiés ? Les conditions nutritives modifient-elles le pouvoir organogène de l'apex ?

Les observations ont porté sur des lots de dix sporophytes de quarante-cinq jours cultivés soit sur le milieu témoin, soit sur les deux milieux expérimentaux (cultures de premier passage).

A. — FONCTIONNEMENT DES POINTS VÉGÉTATIFS PRINCIPAUX.

1^o Nombre et degré de développement des feuilles visibles à l'œil nu, formées par l'apex principal en quarante-cinq jours. — Le nombre moyen des feuilles formées en quarante-cinq jours par le bourgeon terminal est égal à dix chez les témoins, treize chez les sporophytes carencés en calcium (type 1) et quatorze chez les sporophytes cultivés en présence d'un excès de magnésium.

Sur chaque milieu étudié, le nombre des feuilles est extrêmement constant, comme a permis de le vérifier le calcul des limites de sécurité (égales à $\pm 0,58$ dans les deux premiers cas et à $\pm 1,1$ dans le troisième).

En d'autres termes, les apex principaux des cultures traitées forment plus de feuilles que ceux des témoins. La nutrition défavorable, dans les conditions envisagées, n'entraîne pas l'arrêt ou la diminution de l'activité organogène du méristème terminal; la ramification du rhizome se produit bien que l'apex principal ait conservé un fort pouvoir initiateur.

Cependant, les feuilles formées diffèrent, en grandeur et en forme, sur les trois types de sporophytes. L'étude comparative de la composition foliaire (tableau XLII), effectuée au cours du même essai (cultures d'été de vingt-sixième repiquage), montre que les sporophytes ramifiés portent des feuilles épanouies moins nombreuses.

Sur le milieu témoin, on compte quatre feuilles à larges folioles déployées sur dix formées; *en absence de calcium*, trois sur treize; et enfin, dans le cas d'un excès de magnésium, sur quatorze feuilles on n'observe plus qu'exceptionnellement ce type foliaire: presque toutes les feuilles sont palmées ou enroulées en crosse.

Quand les conditions nutritives sont défavorables, les feuilles sont plus nombreuses, mais aussi moins développées que celles observées chez le sporophyte témoin.

(1) Le dénombrement des racines, quoique effectué, n'apporte pas de renseignements particuliers sur le fonctionnement de l'apex. Dans certains cas, la présence d'ébauches radiculaires sera mentionnée par souci de précision.

2^o *Nombre et degré de développement des ébauches foliaires du bourgeon terminal.* — L'observation sous la loupe binoculaire montre que les bourgeons terminaux de tous les sporophytes comportent deux

		Explantat																Apex	
		F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	F ₁₀	F ₁₁	F ₁₂	F ₁₃	F ₁₄	F ₁₅	F ₁₆		
milieu témoin		●	●	●	+	+	+	+	+	▲									
		●	●	●	+	+	+	+	+	▲									
		●	●	●	+	+	+	+	+	▲									
		●	●	●	+	+	+	+	▲	▲	▲								
		●	●	●	●	+	+	+	+	▲	▲								
		●	●	●	●	+	+	+	+	▲	▲								
		●	●	●	●		+	+	+	▲	▲								
		●	●	●	●		+	+		▲	▲								
		●	●	●	●		+	+		▲	▲								
		●	●	●	●		+	+	+	+	▲								
milieu sans Ca		●	●	●	●	●	+	+	+	+	▲	▲	▲	▲					
		●	●	●	●	●		+	+	▲	▲	▲	▲						
		●	●	●	●	●		+	+	+	+	▲	▲	▲	▲				
		●	●	●	●	●		+	+	+	+	▲	▲	▲	▲				
		●	●	●	●	●		+	+	+	+	▲	▲	▲	▲				
		●	●	●	●	●		+	+	+	+	▲	▲	▲	▲				
		●	●	●	●	●		+	+	+	+	▲	▲	▲	▲				
		●	●	●	●	●		+	+	+	+	▲	▲	▲	▲				
		●	●	●	●	●		+	+	+	+	▲	▲	▲	▲				
		●	●	●	●	●		+	+	+	+	▲	▲	▲	▲				
milieu *Ca opt/ Mg hyper*		●	●	●	●	●		▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲
		●	●	●	●	●	+	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲					
		●	●	●	●	●	●	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲					
		●	●	●	●	●	●	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲					
		●	●	●	●	●	●	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲					
		●	●	●	●	●	●	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲					
		●	●	●	●	●	●	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲					
		●	●	●	●	●	●	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲					
		●	●	●	●	●	●	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲					
		●	●	●	●	●	●	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲					

TABLEAU XLII. — Types de feuilles portés par les sporophytes de *M. d.* cultivés pendant 45 jours sur le milieu témoin, sur le milieu sans calcium et sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper/K opt » (cultures d'été de 26^e repiquage).

Les points correspondent aux feuilles palmées; les croix, aux feuilles épanouies, et les triangles, aux feuilles qui peuvent ne pas avoir terminé leur développement.

ébauches foliaires avant la dernière feuille visible à l'œil nu. La taille de ces ébauches est peu différente dans les trois groupes étudiés.

L'apex comprend donc le même nombre de feuilles non développées. Seul varie avec la composition du milieu nutritif le nombre de celles déjà différenciées. Les processus de la morphogenèse foliaire se déroulent plus rapidement en cas de déséquilibre nutritif: la différenciation des feuilles

doit, en effet, être plus rapide, ce qui explique, d'une part, qu'elles ne peuvent atteindre l'état adulte normal (feuilles épanouies), et, d'autre part, que l'augmentation du nombre des organes développés n'est pas corrélative de celle du nombre des ébauches.

EN RÉSUMÉ, au bout de quarante-cinq jours, le point végétatif principal a donc initié, sur le milieu de référence, dix feuilles et deux ébauches, sur le milieu dépourvu de calcium, treize feuilles et deux ébauches, et sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper », quatorze feuilles et deux ébauches. Il apparaît donc que, *sur les deux milieux défavorables, l'apex a un pouvoir organogène plus grand, alors que les organes qu'il forme ont un niveau de croissance plus bas*; dès maintenant, il est donc nécessaire de dissocier les deux phénomènes : initiation d'organes et croissance ultérieure de ceux-ci.

B. — FONCTIONNEMENT DES POINTS VÉGÉTATIFS LATÉRAUX.

1° Nombre de feuilles visibles à l'œil nu portées par les ramifications. — Les feuilles portées par les ramifications du rhizome principal n'ont pu être dénombrées que sur les cultures traitées. Sur les témoins, en effet, les bourgeons latéraux ne présentent pas d'organes suffisamment développés pour être visibles.

Les tableaux XLIII et XLIV groupent les résultats obtenus. Le nombre des feuilles secondaires y est établi en fonction de la position sur le rhizome principal de la feuille « axillante » et en fonction de l'aspect extérieur que présente l'apex : sain ou nécrotique.

Il ressort que :

a. *Le développement des bourgeons latéraux en ramifications (explicité par le nombre de feuilles secondaires qu'ils initient) se produit avant la nécrose de l'apex principal.*

Dans huit cas sur dix (carence calcique), dans cinq cas sur dix (excès de magnésium), il a lieu alors que le bourgeon terminal est normalement chlorophyllien et turgescant.

b. *La levée de la dominance apicale, traduite par l'entrée en activité des bourgeons latéraux, n'est pas due à la mort par nécrose de l'apex principal.* Rappelons que nous étions déjà arrivée à cette conclusion à la suite d'expériences relatées pages 224 et 291.

Cependant, en accord avec nos résultats précédents :

— le nombre des feuilles secondaires est lié à l'état du bourgeon terminal : lorsqu'il est nécrotique, les ramifications sont plus feuillues ;

— les ramifications sont d'autant plus développées et portent des feuilles secondaires d'autant plus nombreuses qu'elles sont plus éloignées du bourgeon terminal ;

TABLEAU XLIII. — NOMBRE DE FEUILLES PORTÉES SUR LES RAMIFICATIONS FORMÉES SUR DES SPOROPHYTES CARENCÉS EN CALCIUM.
(Cultures de premier passage, type 1.)

Explantat	FEUILLES PRINCIPALES.													APEX.		NOMBRE DE FEUILLES secondaires par culture.	ÉTAT DE L'APEX principal.
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	F ₁₀	F ₁₁	F ₁₂	F ₁₃				
1	1														2	Vert.	
															0	Vert.	
1	1	1	1	1	1										5	Vert.	
1	1	1	1	1	1	1									6	Vert.	
3	1	1	1	1											6	Vert.	
	2		2		1										5	Vert.	
2	2				1	1	1								7	Vert.	
5	1	1	1	1	1	1	1								11	Vert.	
3	2			1	2	4	2	2	1	1					18	Brun.	
1	5	2	3	4	3	2	1	1	2						24	Brun.	
71	16	8	8	11	10	6	3	2	3	0	0	0	0				

TABIEAU ALIV. NOMBRE DE FEUILLES PORTÉES PAR LES RAMIFICATIONS FORMÉES SUR DES SPOROPHYTES CULTIVÉS SUR LE MILIEU A
 « Ca opt/Mg hyper/K opt ». (Cultures de premier passage.)

FEUILLES PRINCIPALES.															APEX.		NOMBRE DE FEUILLES : secondaires par culture.	ÉTAT DE L'APEX principal.
Explantat		F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	F ₁₀	F ₁₁	F ₁₂	F ₁₃	F ₁₄	F ₁₅		
		1	1	1	2	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	7	Vert.
		—	2	2	4	2	1	2	1	1	—	—	—	—	—	—	15	Vert.
		3	3	2	6	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	16	Vert.
		4	2	2	6	1	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	17	Vert.
		4	4	1	3	6	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	22	Verdâtre.
		5	3	2	3	2	3	2	2	1	1	1	—	—	—	—	25	Brun.
		4	3	3	4	4	2	2	2	2	2	2	—	—	—	—	30	Brun.
		3	4	2	2	1	2	2	1	1	—	1	—	—	—	—	19	Brun.
		1	1	1	5	5	2	5	1	6	1	4	2	—	—	—	34	Brun.
		5	6	7	6	4	4	2	3	3	—	—	—	—	—	—	40	Brun.
30	29	23	41	25	20	18	11	14	4	8	2	0	0	0	0			

— enfin, si l'on compare les effets des deux milieux expérimentaux, on notera une fois encore que la carence en calcium provoque un buissonnement moins intense qu'un excès de magnésium.

2° Organes à l'état d'ébauches dans les bourgeons latéraux (cultures témoins) ou dans les ramifications (cultures traitées). Les observations faites sous la loupe binoculaire ont permis d'apporter certaines précisions qu'un examen à l'œil nu n'avait pu donner. Elles portent, d'une part, sur le degré de développement des bourgeons latéraux des témoins et, d'autre part, sur la présence de bourgeons à la base des feuilles secondaires des cultures ramifiées.

Pour tous les sporophytes, l'étude a porté sur les bourgeons latéraux placés à la base des feuilles principales F_2 , F_4 , F_6 , F_8 , F_{10} et des jeunes ébauches foliaires de l'apex principal (fig. 73).

I. SUR MILIEU TÉMOIN. — A la base des deux ébauches de l'apex, les bourgeons se présentent sous la forme de protubérances petites et molles. Il est impossible d'y distinguer des organes foliaires ou radiculaires. *Les bourgeons latéraux sont donc visibles très tôt.*

— A tous les autres niveaux, les points végétatifs latéraux BL_1 portent toujours deux ébauches foliaires Fj_1 et une ébauche radiculaire Rj_1 . Les méristèmes extra-axillaires correspondant à ces très jeunes feuilles ne sont pas visibles.

Au fur et à mesure que l'on s'éloigne de l'apex principal, on observe un grossissement graduel de ces organes. Tous les bourgeons latéraux sont bien chlorophylliens ; cependant, près de l'explantat (F_2), ils sont nécrotiques. Ils correspondent à la région la plus anciennement formée de la culture, en voie de dégénérescence.

II. SUR MILIEU SANS CALCIUM. — Au niveau de l'apex principal, les bourgeons latéraux BL_1 sont plus gros que chez les témoins : une jeune racine est très nettement observable. Ils ne sont pas toujours exemptés par la nécrose.

— A la base des feuilles différenciées proches de la pointe de l'axe, les bourgeons BL_1 , chlorophylliens ou brunâtres suivant que la culture a plus ou moins souffert de la carence, comportent deux ébauches foliaires Fj_1 et une à deux ébauches radiculaires Rj_1 bien développées.

— Au fur et à mesure que l'on se rapproche de la base, on observe que les feuilles secondaires sont plus nombreuses et plus développées. Certaines d'entre elles sont bifides. Les bourgeons associés aux plus âgées, BL_2 , sont toujours visibles et montrent souvent une jeune racine.

III. SUR LE MILIEU A « CA OPT/MG HYPER/K OPT ». — Les modifications sont du même type que celles décrites précédemment : les nécroses frappant les bourgeons latéraux sont plus fréquentes, les organes formés plus nombreux et plus développés. A la base de la culture, les bourgeons

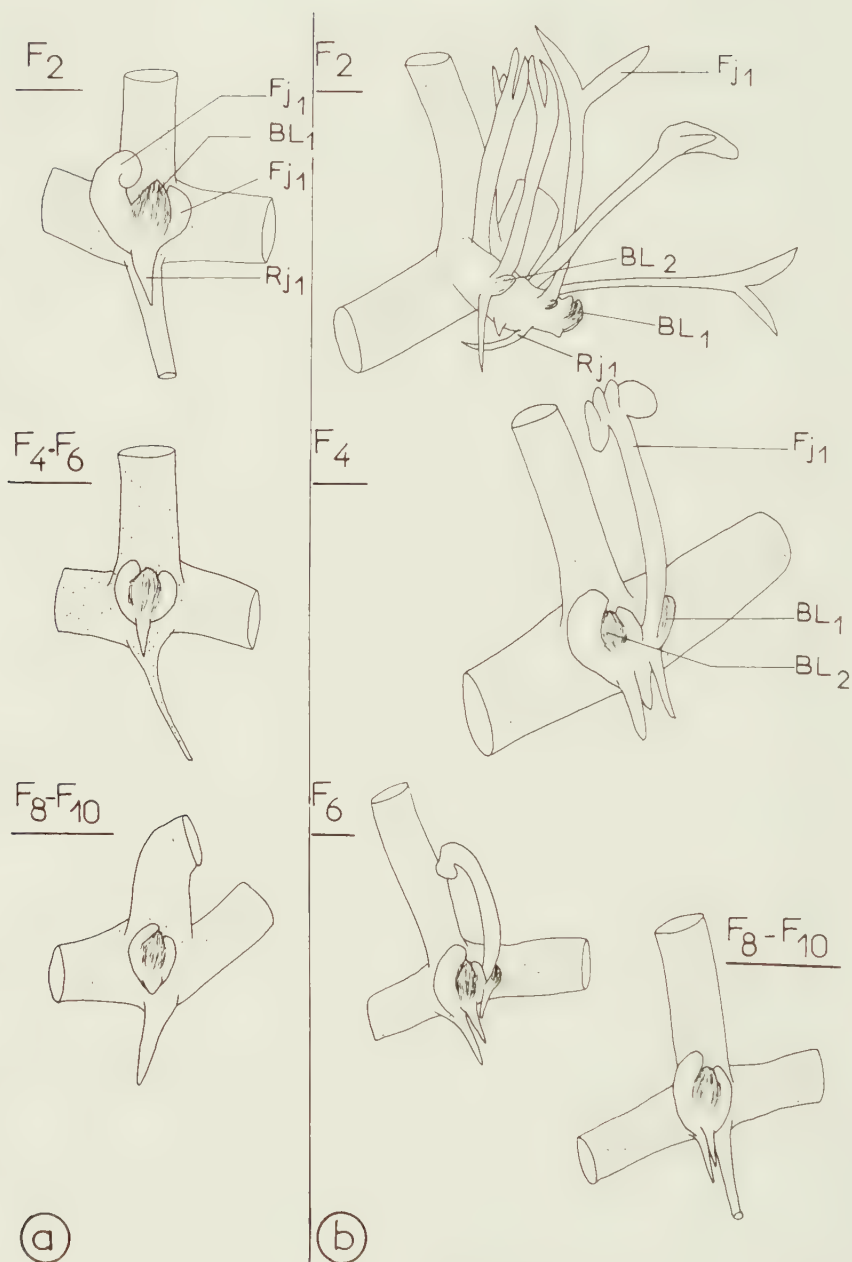
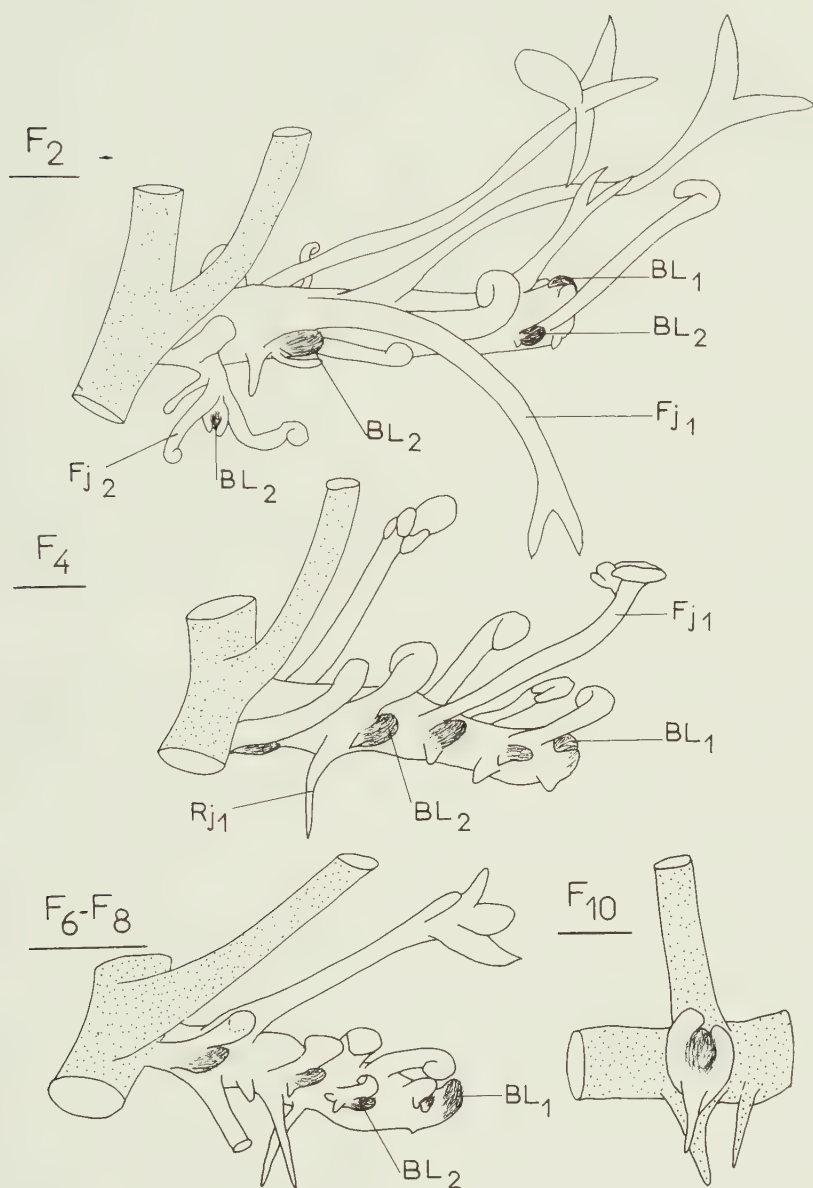


FIG. 73. — Degrés de développement des bourgeons latéraux présents aux différents nœuds du rhizome des sporophytes témoins et des sporophytes ramifiés.

a : bourgeons latéraux d'un sporophyte témoin. — *b* : bourgeons latéraux et ramifications d'un sporophyte carencé en calcium. — *c* : bourgeons latéraux et ramifications d'un sporophyte cultivé sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper ».



(C)

Le rhizome, les feuilles et les racines principaux, ont été représentés en pointillé.

BL₁, bourgeon latéral porté sur le rhizome principal ; *Fj₁*, jeune feuille initiée par *BL₁* ; *Rj₁*, jeune racine initiée par *BL₁* ; *BL₂*, bourgeon latéral porté par la ramification issue de l'activité de *BL₁* ; *Fj₂*, jeune feuille initiée par *BL₂*.

BL₂ correspondant aux feuilles secondaires les plus anciennes sont entrés en activité et ont donné des ramifications d'ordre 2 dont la présence a déjà été signalée. Ces dernières portent des feuilles rudimentaires (Fj₂).

Ces observations vérifiant nos descriptions antérieures mettent aussi en évidence des faits jusqu'alors ignorés :

a. *L'initiation des bourgeons latéraux est très précoce.* La ramification provoquée par un déséquilibre nutritif approprié s'opère donc à partir d'organes initiés normalement ; seule leur faculté de développement ultérieur est sous l'étroite dépendance de la nutrition.

b. *Chez les témoins, les bourgeons latéraux ont tous esquissé une légère croissance, d'autant plus faible qu'elle s'effectue dans une région plus proche de l'apex principal.* Dans la partie basale, les bourgeons, un peu plus développés, sont bruns et cassants : la mort par nécrose frappe donc un organe qui n'a fait qu'ébaucher son épanouissement. *L'inhibition de nature hormonale effectuée par l'apex principal et les organes foliaires et radiculaires est donc une inhibition d'allongement et non une inhibition de formation.*

c. *Sur les deux milieux expérimentaux s'effectue le développement des bourgeons latéraux.* L'amplitude en est très nettement supérieure à celle constatée chez les témoins, mais varie suivant un processus assez semblable : plus on s'éloigne du bourgeon terminal, plus les ramifications sont longues. On retrouve là un résultat déjà fourni à maintes occasions.

On notera, en outre, que :

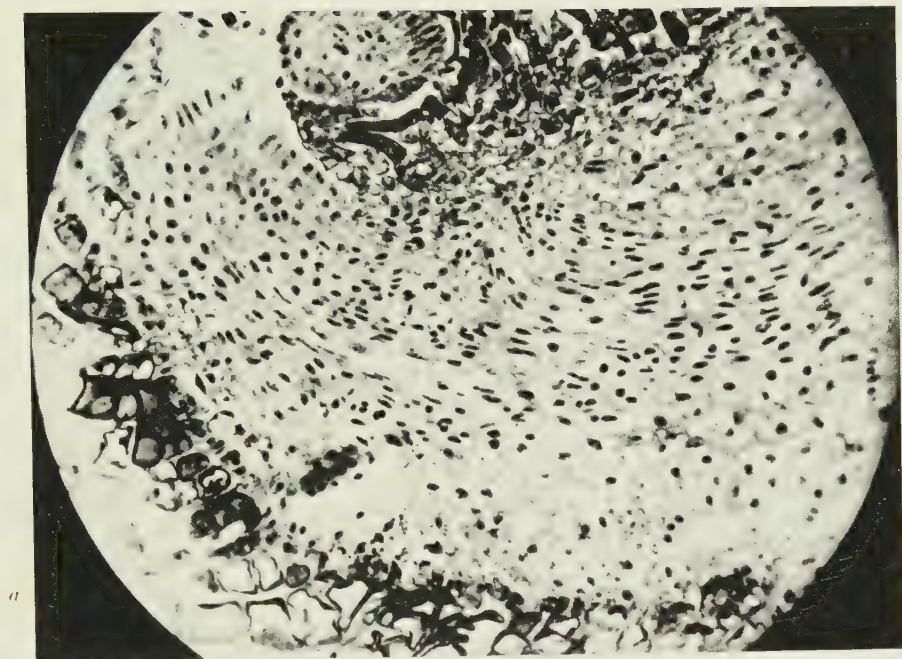
1° Les apex des ramifications les plus longues, souvent nécrotiques, n'inhibent plus leurs propres bourgeons qui entrent en activité (ramifications de second ordre) ;

2° La mort par nécrose des bourgeons latéraux, souvent observée, est postérieure à leur développement plus ou moins intensif. Elle n'épargne pas ceux qui sont proches de l'apex principal.

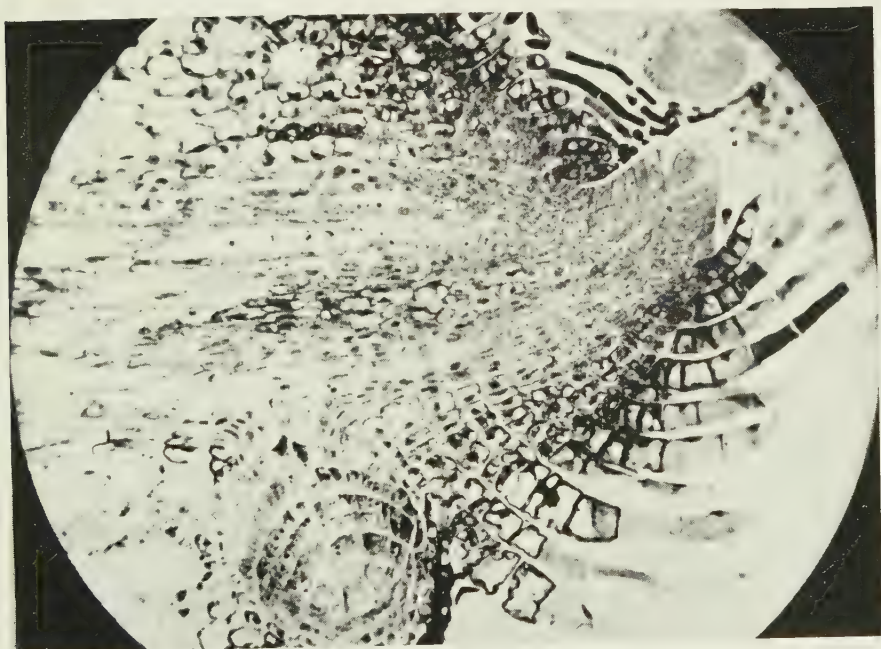
Structure des apex principaux et latéraux des sporophytes témoins ou ramifiés.

Les coupes longitudinales verticales axiales ont été pratiquées dans les apex principaux ou latéraux, sains d'aspect ou nécrotiques, des trois groupes de sporophytes, quarante-cinq jours après la mise en culture.

Les bourgeons latéraux des témoins, ou les apex des ramifications des sporophytes traités, sont ceux qui correspondent aux feuilles principales F₆ à F₁₀.



a



b

FIG. 74. — Coupes longitudinales axiales de l'apex principal (a) et d'un apex latéral (b), d'un sporophyte témoin de *M. d.*

Alcool/formol...-hématoxyline ($\times 200$).

La structure histologique du bourgeon latéral *latent* est très comparable à celle du bourgeon principal *actif*.

A. — STRUCTURE DES APEX DU SPOROPHYTE TÉMOIN.

1^o Apex principal. — Le sommet de l'axe principal (fig. 74 *a* et 75) est fortement recourbé vers le côté dorsal du rhizome.

a. Il est occupé par une grande cellule tétraédrique (triangulaire en section), la cellule apicale (1), entourée par trois ou quatre cellules prismatiques (rectangulaires en section) : ces cellules vacuolisées ont chacune un noyau peu colorable.

b. Au-dessous se trouvent des cellules à cytoplasme plus dense et à noyaux plus petits, fortement chromophiles, surtout au niveau des couches superficielles : c'est la région organogène où s'initient et commencent à se développer les racines et les feuilles.

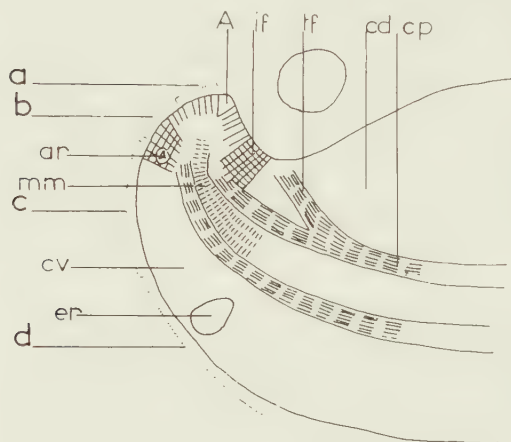


FIG. 75. — Schéma d'interprétation de la figure 74 *a*.

a, zone apicale ; *b*, zone organogène ; *c*, zone d'élongation ou zone sub-apicale ; *d*, zone de maturation ; *A*, cellule apicale ; *if*, initium foliaire ; *tf*, trace foliaire ; *ar*, apicale de racine ; *er*, ébauche de racine ; *cd* et *cv*, cortex dorsal et ventral ; *cp*, cordons procambiaux ; *mm*, méristème médullaire.

l'aérenchyme et le parenchyme cortical. Les nombreuses divisions et l'élongation cellulaire qui ont lieu dans cette zone ont pour résultat de donner une longue région d'allongement située entre la base du cône et la zone de maturation (ce qui explique que les témoins portent des nœuds espacés et que le rhizome n'acquiert que très progressivement ses dimensions définitives).

d. Sous cette région, on n'observe plus que des tissus différenciés.

Cette zonation correspond à celle décrite par WARDLAW [218] : il

(1) Il n'entre pas dans le cadre de cette étude de déterminer le rôle de la cellule apicale dans l'ontogenèse du sporophyte. Bornons-nous à signaler que, pour SCHNEIDER [161] et BONNET [37], c'est de son activité que naît toute la plante, alors que selon BIVAT [49-50] les cellules les plus apicales ne jouent pas un rôle déterminant et sont « foncièrement passives », ce rôle revenant à la « couronne subapicale placée latéralement ».

distingue, en effet, la *distal region*, que nous avons décrite à *a*, la *subdistal and organogenic region* (b), la *subapical region* (c), et enfin la *region of maturation* (d). Elle ne doit pas laisser penser qu'il existe une discontinuité entre les différentes régions décrites. Rien ne permet, en effet, de supposer qu'elles sont autonomes.

L'apex est fortement dorsi-ventral : du côté ventral naissent les racines ; du côté dorsal s'initient les feuilles. Les bourgeons latéraux ont la même origine que les feuilles : tôt arrêtés dans leur développement alors que la feuille correspondante continue sa croissance, ils sont placés sous elle et plus extérieurement ; d'où leur position extra-axillaire. Les coupes longitudinales médianes ne permettent donc pas leur étude. Sur les coupes tangentielles, on peut les observer, mais ils ne montrent alors qu'une partie de leurs tissus.

La forte courbure du dôme apical s'explique par la division plus active et l'élargissement plus précoce des cellules ventrales.

La protection de l'apex est assurée par de nombreux poils pluricellulaires unisériés (très riches en tanins) et non par les feuilles : celles-ci n'acquiescent un certain degré de développement que trop loin de la pointe de l'axe.

La région méristématique s'étend sur une longueur d'environ 550 à 600 μ comptés à partir de la cellule apicale ; les premières trachéides (le procambium est le tissu qui se différencie le moins vite) n'apparaissent qu'à 660 μ (1) (tableau XLV).

TABLEAU XLV. — INFLUENCE DE LA COMPOSITION MINÉRALE DES MILIEUX NUTRITIFS SUR LA DIFFÉRENCIATION DES TRACHÉIDES.

Les distances (exprimées en microns) sont celles mesurées de la cellule apicale aux premières trachéides.

MILIEU témoin.		MILIEU DÉPOURVU DE CALCIUM.				MILIEU à « Ca opt/Mg hyper/K opt ».		
		Type 1.		Type 3.		1 ^{er} passage.		2 ^e passage.
		Chloro-phyllien.	Nécrosé.	Chloro-phyllien.	Nécrosé.	Chloro-phyllien.	Nécrosé.	Chloro-phyllien.
Apex principal.	660 μ	400 μ	370 μ	220 μ	280 μ	340 μ	380 μ	250 μ
Apex latéral.	230 μ	360 μ	380 μ	250 μ	250 μ	340 μ	380 μ	330 μ

(1) Ces chiffres et ceux qui seront donnés au cours de cette étude correspondent à la moyenne de mensurations effectuées sur 8 à 10 coupes.

L'étude des noyaux (1), colorés par le réactif de Schiff, confirme la zonation du point végétatif qui vient d'être décrite (fig. 76 *a* et 77 *a*) :

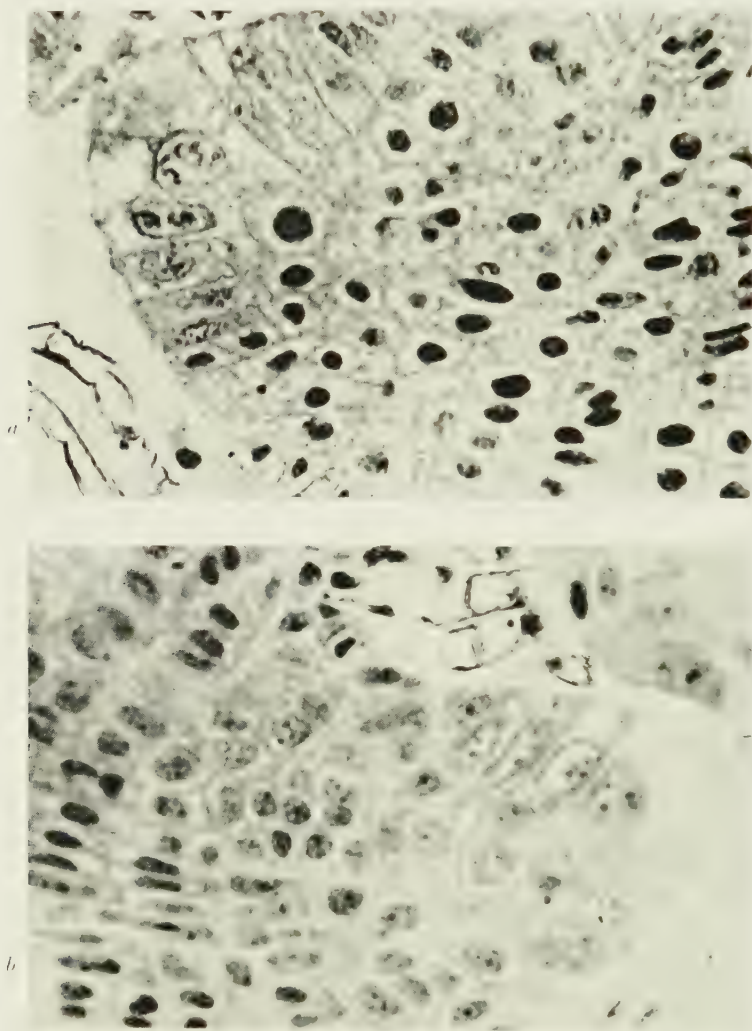


FIG. 76. — Coupes longitudinales axiales de l'apex principal (*a*) et d'un apex latéral (*b*), d'un sporophyte témoin de *M. d.* Helly Feulgen ($\times 600$).

En *a*, on remarquera que les noyaux des cellules les plus apicales sont gros et peu chromophiles tandis que ceux des zones organogène et sub-apicale sont plus petits et riches en ADN.

En *b*, les noyaux interphasiques sont moins nombreux qu'en *a*.

alors que l'extrême pointe de l'axe comporte de gros noyaux peu riches en acide désoxyribonucléique (ADN), au réseau chromatique lâche et peu colorable, dans les régions très méristématiques (à la base du dôme et

(1) Les différents états (quiescent, interphasique) et les phases successives de la mitose ont longuement été décrits par DE LITARDIÈRE [126].

dans la région d'élongation), les noyaux violemment colorés, à réseau chromatique dense, de petite taille, sont riches en ADN. Les nucléoles

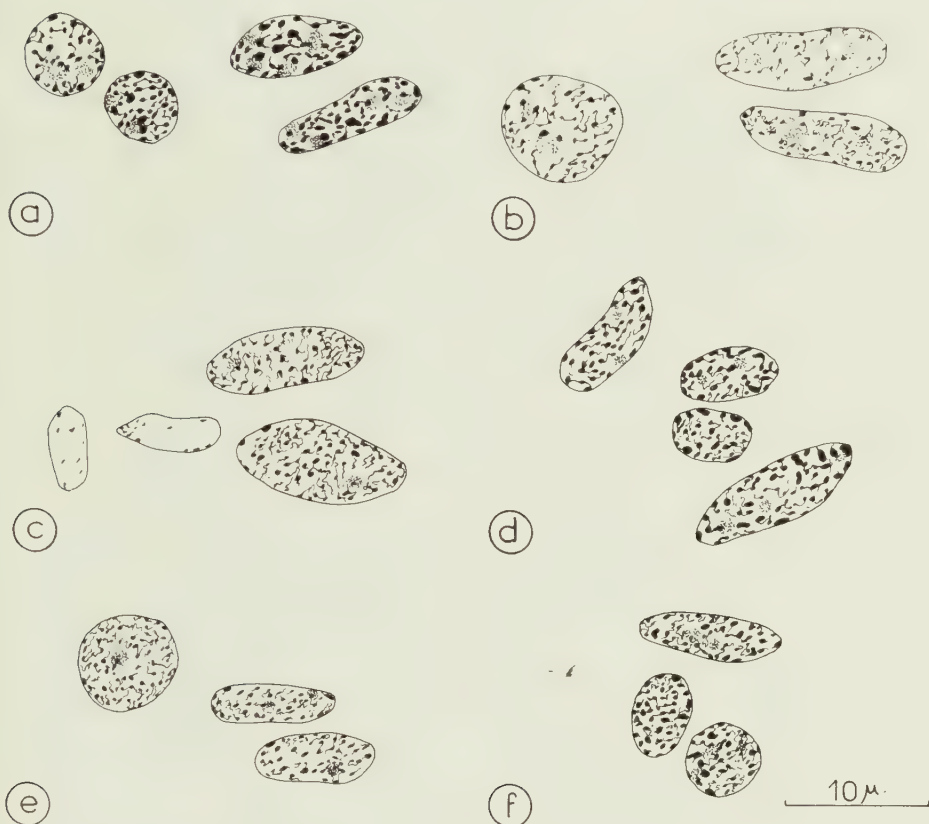


FIG. 77. — Aspect des noyaux des apex principaux et latéraux (niveau de la zone sub-apicale)

a et *b* : sporophyte témoin. — *c* et *d* : sporophyte cultivé sur milieu sans calcium. — *e* et *f* : sporophyte cultivé sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper ».

A gauche (*a*, *c*, *e*) : au niveau des apex principaux.

A droite (*b*, *d*, *f*) : au niveau des apex latéraux.

y ont une taille légèrement supérieure, mais cette différence n'est pas toujours évidente.

L'étude caryologique montre ainsi que les cellules apicales comportent des noyaux quiescents, alors que, dans les cellules sous-jacentes, les noyaux des cellules soumises à des divisions répétées sont tous interphasiques.

2° Apex latéral. — L'organisation d'un bourgeon extra-axillaire (fig. 74 *b* et 76 *b*) est, en tous points, comparable à celle décrite pour l'apex principal. Cependant, dans ce bourgeon *latent*, les régions méristématiques sont nettement moins étendues par suppression presque totale de la zone d'élongation. Ainsi, les trachéides formées avant l'inhibition de crois-

sance ne se trouvent qu'à $230\ \mu$ de la cellule apicale (tableau XLV).

Le dôme apical est plus pointu et moins large : il est donc légitime de penser que les cellules méristématiques, moins nombreuses, sont à l'état

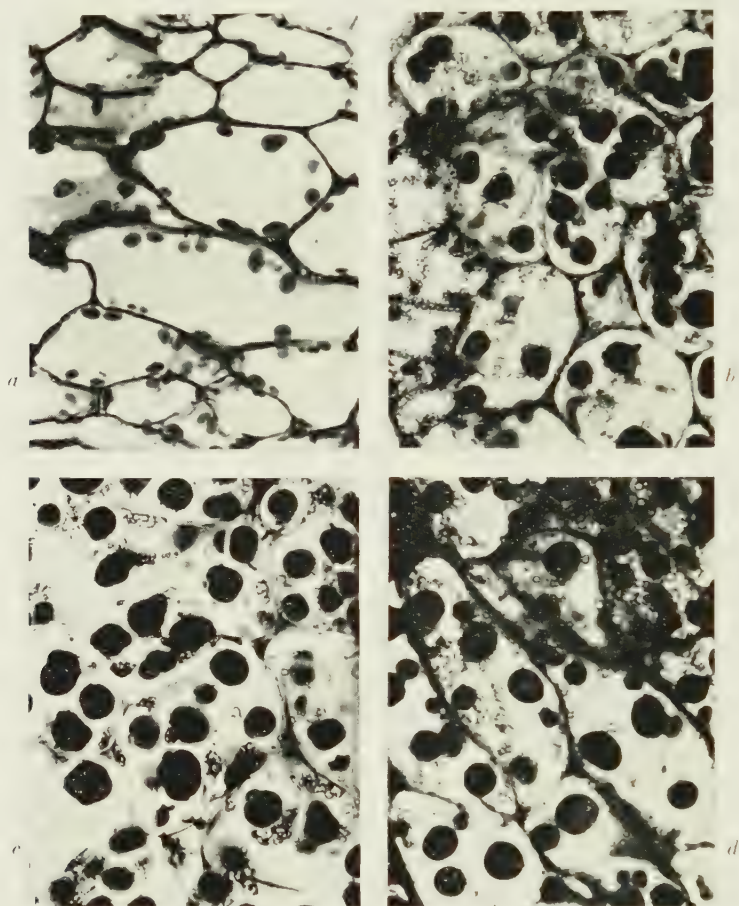


FIG. 78 — Teneur en amidon et en tanins des tissus de sporophytes témoins et des sporophytes ramifiés, Helly/Iugol. Observation faite au niveau du parenchyme cortical de la zone de maturation.

a : sporophyte témoin. — *b* : sporophyte carencé en calcium (type 1). — *c* : sporophyte carencé en calcium (type 3). — *d* : sporophyte cultivé sur le milieu « Ca opt Mg hyper ».

La richesse en amidon et en tanins est, au niveau des apex latéraux, la même qu'à celui des apex principaux.

de repos. L'étude des noyaux vérifie cette assertion : moins chromophiles, plus gros, ils sont moins riches en ADN. Ils sont à peu près tous à l'état quiescent. Les nucléoles, un peu plus petits, sont aussi moins nombreux (fig. 77 *b*).

La latence du bourgeon latéral est donc traduite par l'aspect des noyaux de ses cellules méristématiques.

La mise en évidence histochimique de quelques composés intracellulaires a montré que, dans les tissus témoins, les régions méristématiques des bourgeons principaux ou latéraux ne contenaient pas d'amidon. Au niveau des parenchymes différenciés, on observe quelques petits grains d'amidon (fig. 78, *a*), des tanins précipités peu abondants et quelques fines gouttelettes lipidiques.

Le métabolisme extrêmement actif du rhizome principal se caractérise donc par l'utilisation, au fur et à mesure de leur formation, des produits synthétisés qui, ainsi, ne s'accumulent pas dans les cellules.

Que les mêmes observations aient été faites dans les tissus du bourgeon latéral laisse penser que les métabolites utilisés par ailleurs ne sont plus disponibles pour s'accumuler dans un organe dont la croissance est arrêtée. Cette hypothèse supposant que les organes proliférant activement mobilisent les substances nutritives formées s'inspire de la théorie des « centres d'attraction » de GÆBEL [85, 86]. Elle donne une explication valable, semble-t-il, des faits observés.

EN RÉSUMÉ, il existe de profondes différences entre un point végétatif actif dont le fonctionnement assurera l'édification de la plante entière et un apex passif dont la croissance est rapidement bloquée.

Bien que, dans les deux cas, les différents tissus soient présents dans le même ordre structural, leur degré de développement très différent s'expliquerait par un blocage rapide des mitoses : en effet, *l'état interphasique caractérise les noyaux du méristème actif, tandis que l'état quiescent caractérise les noyaux du méristème passif.*

Dans l'étude des points végétatifs des cultures ramifiées, notre attention se portera donc tout particulièrement sur l'état dans lequel se trouve leurs noyaux.

B. — STRUCTURE DES APEX DES SPOROPHYTES CARENCÉS EN CALCIUM.

1^o Sporophytes de type I. — Type le plus fréquent au cours du premier passage, il comprend, nous l'avons vu, des sporophytes dont les bourgeons peuvent être sains ou nécrotiques. L'étude a donc porté sur ces deux groupes d'apex.

I. APEX PRINCIPAUX. — a. *Apex d'aspect sain* (normalement chlorophyllien et turgescents).

— La pointe du rhizome principal, normalement recourbée vers le côté dorsal (fig. 79), est plus étroite que celle des témoins. La taille des cellules n'étant pas modifiée, c'est donc que leur nombre a diminué.

La zone d'élongation est réduite : la différenciation des trachéides est beaucoup plus précoce ; on observe, en effet, les premières vers 400 μ (tableau XLV).

L'élargissement du rhizome est plus rapide ; il acquiert sa taille définitive presque sous la pointe de l'axe.

En fin de passage, les noyaux sont peu chromophiles, leur forme souvent irrégulière. Le réactif de Schiff les colore en rose rouge plutôt qu'en rose violet comme on l'observe habituellement chez les témoins. Les nucléoles, plus petits, sont peu nombreux.

Le contenu cytoplasmique des cellules tôt différenciées est anormal. Les vacuoles, observées sur le vivant, ne retiennent plus le colorant vital.

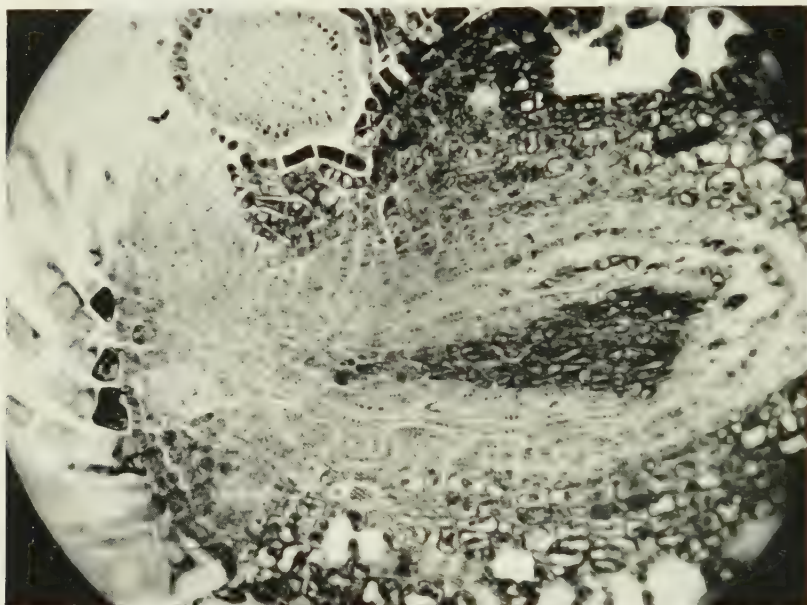


FIG. 79. — Coupe longitudinale axiale de l'apex principal d'un sporophyte carencé en calcium (type 1). Alcool formol...-hématoxyline ($\times 200$).

On notera l'étroitesse du dôme apical et la réduction de la zone sub-apicale. Les tissus tôt différenciés sont riches en tanins.

Les noyaux, aux formes aberrantes, présentent à l'hématoxyline un contenu noir homogène.

Au niveau des tissus médullaires et superficiels placés assez loin de l'apex s'observent des plages nécrotiques (fig. 80).

b. Apex nécrotiques. — La structure d'un apex nécrotique présente des modifications importantes.

Diminution de la courbure de l'apex: le dôme apical, très étroit, forme un angle obtus avec l'axe du rhizome : les cellules étant en nombre à peu près égal sur les deux côtés du rhizome (dorsal et ventral), la pointe ne présente plus sa courbure habituelle.

Modifications des cellules « les plus apicales »: de taille réduite, elles sont très fortement vacuolisées (fig. 81 a).

Dans les cas les plus extrêmes de nécrose, à la pointe du rhizome, les cellules sont déformées et aplaties : l'apicale et ses voisines ne sont plus visibles, soit qu'elles aient été éliminées au moment de la confection de

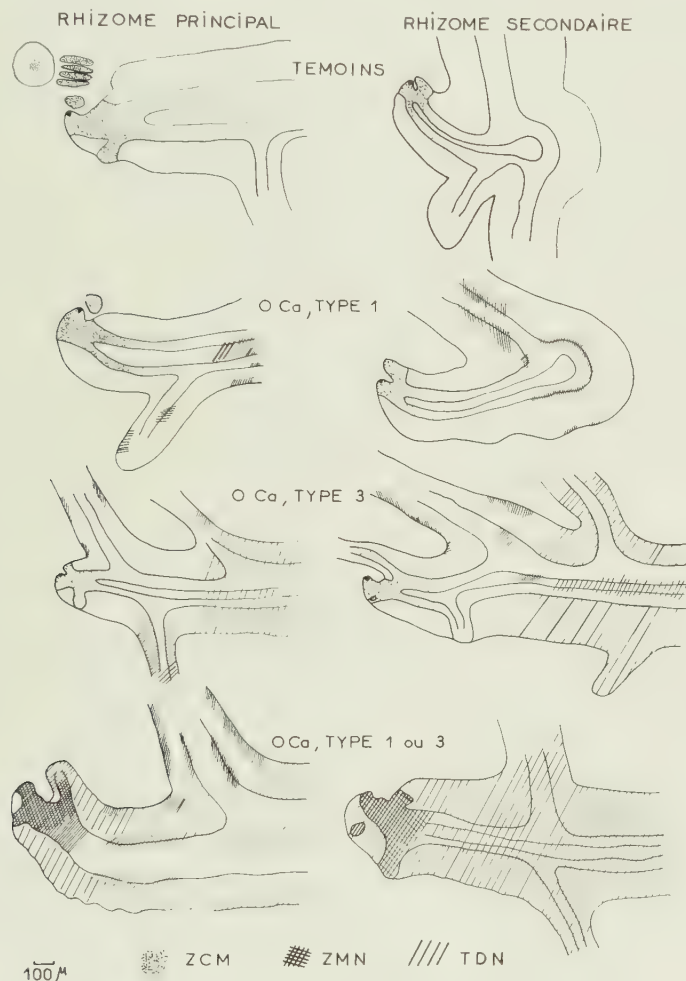


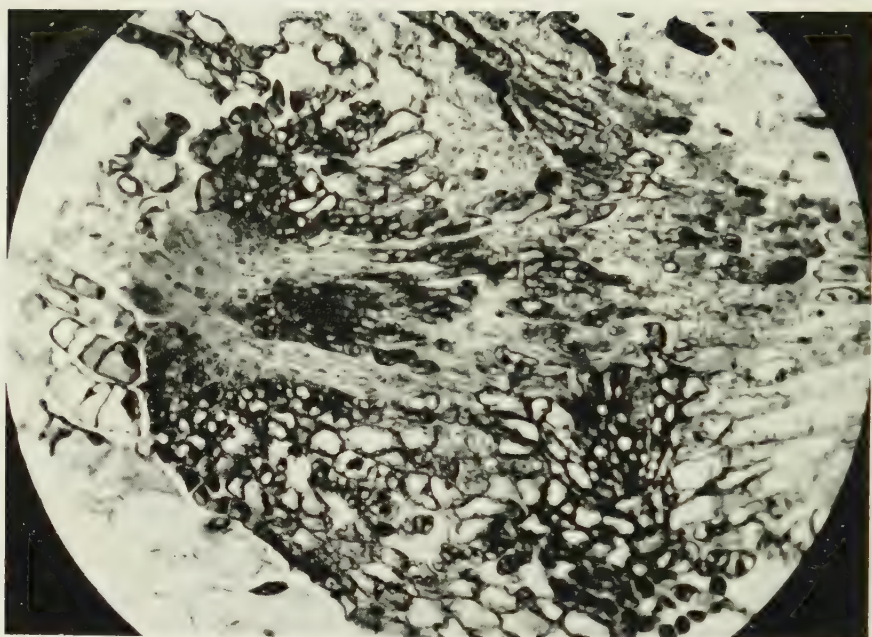
FIG. 80. — Coupes longitudinales axiales schématiques des apex principaux et latéraux de sporophyte témoin et de sporophytes carencés en calcium.

Les apex des cultures témoins ainsi que les tissus différenciés sous-jacents sont exempts de nécroses. Chez les cultures carencées en calcium, on notera la propagation, de la base vers l'apex, de la nécrose (propagation acropète).

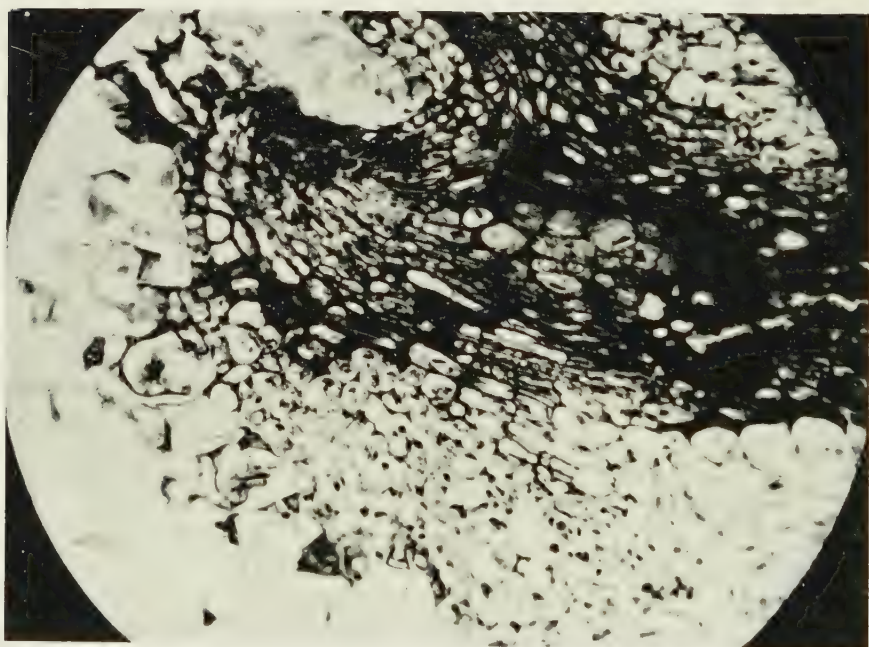
ZCM, zone de cellules méristématiques ; ZMN, zone qui normalement devrait être méristématique et qui, sous l'effet de la carence, s'est nécrosée ; TDN, tissus différenciés nécrosés.

la coupe (les tissus sont très fragiles), soit qu'elles ne soient plus reconnaissables bien que présentes (fig. 81 b).

— *Modifications de la zone d'élongation* : la zone subapicale est presque complètement supprimée (ce qui explique qu'à ce stade les entre-nœuds



a



b

FIG. 81. — Coupes longitudinales axiales d'apex principaux de sporophytes carencés en calcium (type 1). Alcool formol...-hématoxyline ($\times 200$)

Les plages de nécrose sont importantes au niveau des tissus tôt différenciés et n'épargnent pas les jeunes feuilles ni les jeunes racines.

a : les cellules les plus apicales sont encore discernables. — *b* : lésées par la nécrose, les cellules les plus apicales ne sont plus discernables

soient courts). La différenciation de la moelle s'observe presque immédiatement sous le dôme apical. Seuls les tissus procambiaux gardent

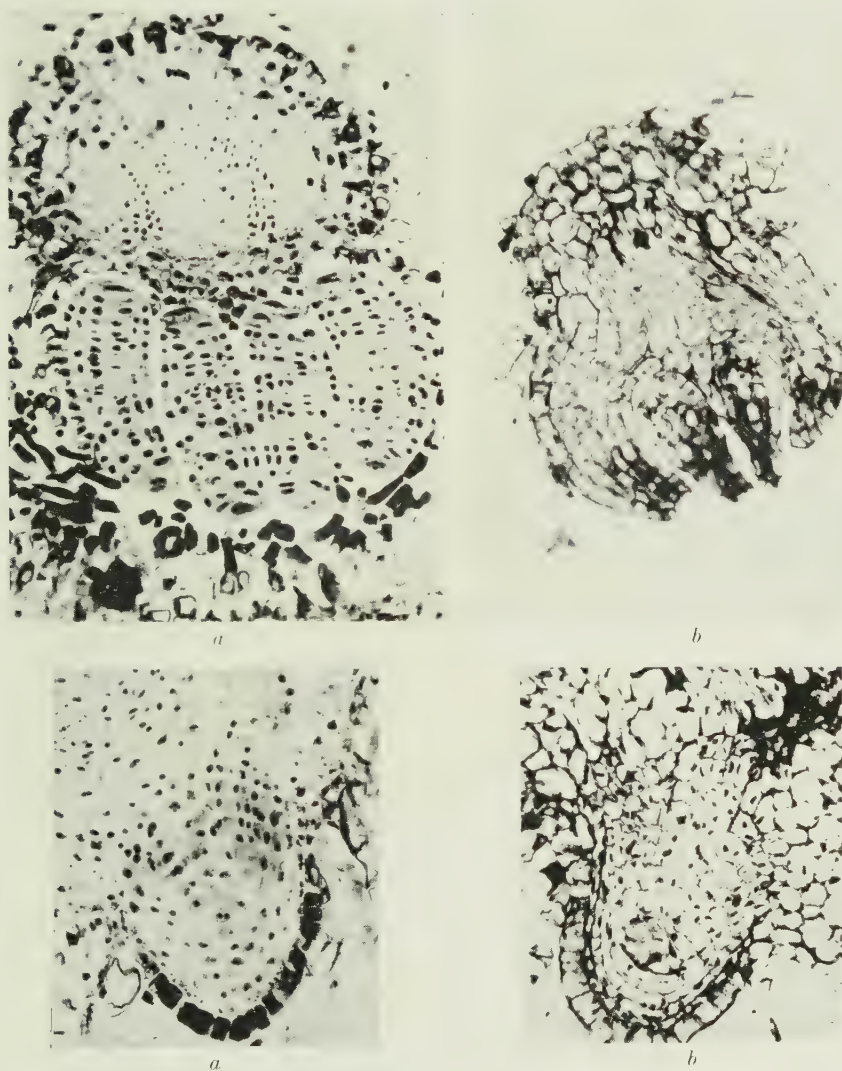


FIG. 82. — Aspect histologique des ébauches foliaires et radiculaires observées au niveau des apex principaux de sporophytes de *M. d.*

a : sporophyte témoin. — *b* : sporophyte carencé en calcium, même aspect chez les sporophytes cultivés sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper ». Alcool/formol...-hématoxyline (> 250).

En *b*, on remarquera que les cellules sont presque toutes autolysées.

encore leurs caractères méristématiques : les trachéides sont cependant différenciées à un niveau plus proche de l'apex que chez les témoins (à 370μ).

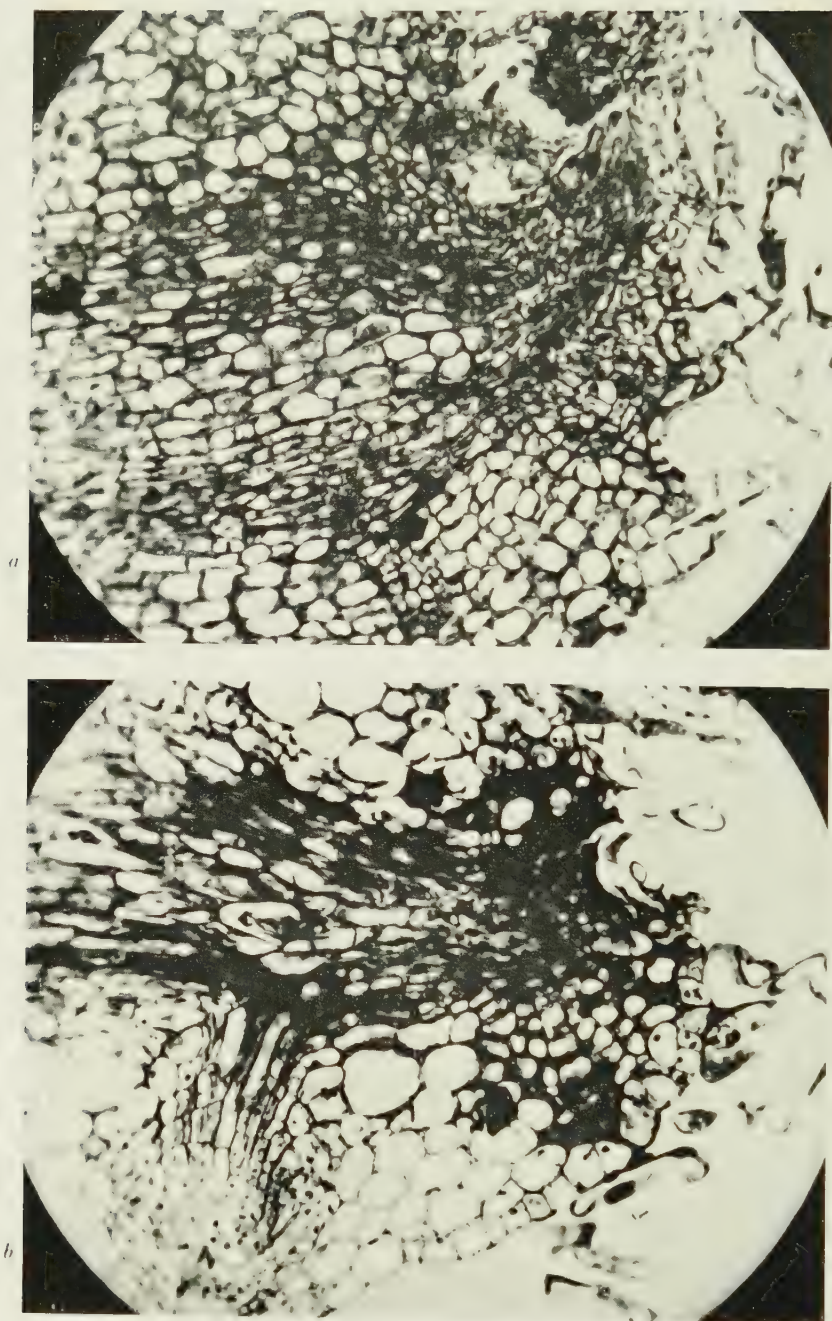


FIG. 83. — Coupes longitudinales axiales d'apex latéraux de sporophytes carencés en calcium (type 1). Alcool formol...-hématoxyline ($\times 200$).

Mêmes légendes que celles de la figure 81

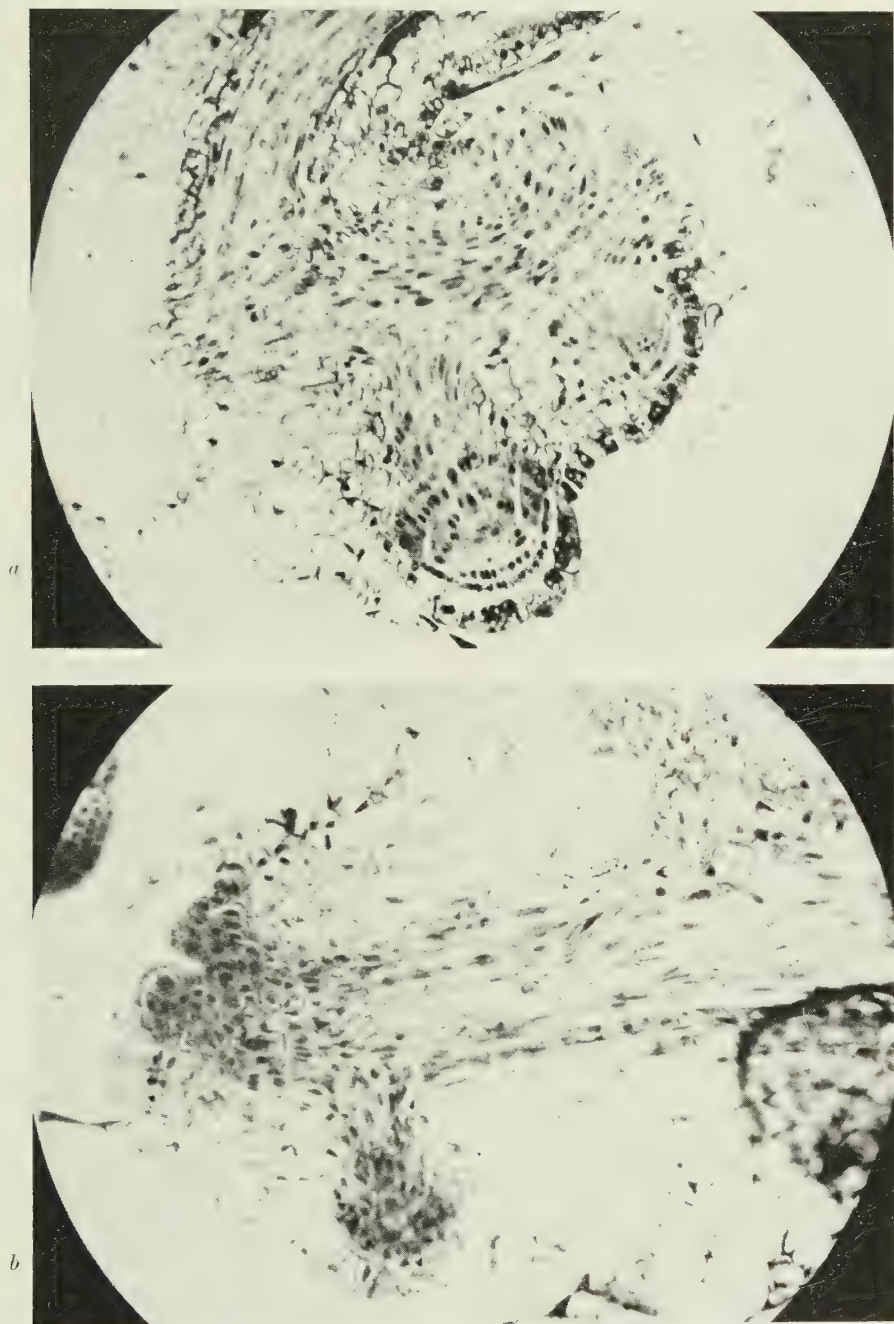


FIG. 84. — Coupes longitudinales axiales de l'apex principal (*a*) et d'un apex latéral (*b*) de sporophytes carencés en calcium (type 3). Alcool/formol...-hématoxyline ($\times 200$).

En *a*, on remarquera l'étroitesse du dôme apical et la réduction importante de la zone sub-apicale.

En *b*, la zone méristématique, également très réduite, comporte des noyaux plus chromophiles qu'en *a*.

Modifications de la structure et du contenu cellulaire: le protoplasme des cellules indifférenciées est fortement coloré par l'hématoxyline. Il est contracté ou parfois absent (autolyse).

Au niveau des tissus différenciés, les plages nécrotiques sont abondantes et tendent à envahir tous les tissus (fig. 80). Les parois cellulaires sont très épaisses. Les racines et les feuilles à l'état d'ébauches, ainsi que celles qui se sont déjà développées, sont complètement nécrotiques (fig. 82). Les cellules sont riches en amidon (grains énormes et fortement colorés par le lugol) et en tanins (fig. 78 *b*). Les matières lipidiques sont très abondantes.

II. APEX LATÉRAUX. — a. *Apex latéral d'aspect sain.* — Le bourgeon latéral « sain » a été observé sur des cultures dont l'apex terminal était lui-même le plus souvent chlorophyllien et normalement turgescant.

L'apex des ramifications est peu différent de l'apex principal. La zone d'élongation est plus développée qu'au niveau du bourgeon extra-axillaire des cultures témoins (fig. 80). Les trachéides sont différenciées à environ 300 μ (tableau XLV). Bien que les noyaux soient quiescents au moment de l'observation, ils se sont divisés plus longtemps et plus activement, puisque le bourgeon est plus développé qu'il ne l'est sur le milieu nutritif de référence. L'apex principal comportant lui aussi des noyaux au repos, il y a donc, au niveau des deux types d'apex, diminution d'activité en fin de passage due sans doute à un métabolisme appauvri ou perturbé.

b. *Apex latéral nécrotique.* — L'observation d'apex de ce type aboutit aux mêmes conclusions que celles tirées de l'étude des apex principaux : nécroses importantes des cellules méristématiques, apicales peu ou pas discernables, cellules autolysées réduites à leurs parois épaisses et brunes (fig. 80 et 83 *a* et *b*).

La mort des tissus n'a lieu cependant que lorsque la ramification a déjà effectué un développement appréciable, puisque, dans tous les cas observés, son élongation est au moins double de celle mesurée sur un bourgeon latéral de sporophyte témoin.

2° *Sporophyte de type 3.* — Comme dans le cas du type 1, nous considérerons ici la structure que présentent les apex sains ou nécrotiques des sporophytes de quarante-cinq jours, cultivés pendant deux ou trois passages sur milieu sans calcium.

II. APEX PRINCIPAUX. — a. *Apex d'aspect sain.* — Les modifications observées sont comparables à celles qui affectent les sporophytes de type 1. Elles sont plus accentuées (fig. 84 *a* et 85 *a*). On observe en effet :

La diminution des dimensions du dôme apical: cette diminution de taille est, comme pour le type 1, due principalement au faible nombre des cellules méristématiques plus qu'à une diminution de leur taille. Cependant, la dorsiventralité est normale.

— *La réduction considérable de la zone subapicale* : la différenciation des cellules méristématiques est très précoce (nœuds extrêmement rapprochés du rhizome). Les trachéïdes sont visibles à $220\ \mu$ comptés à partir de

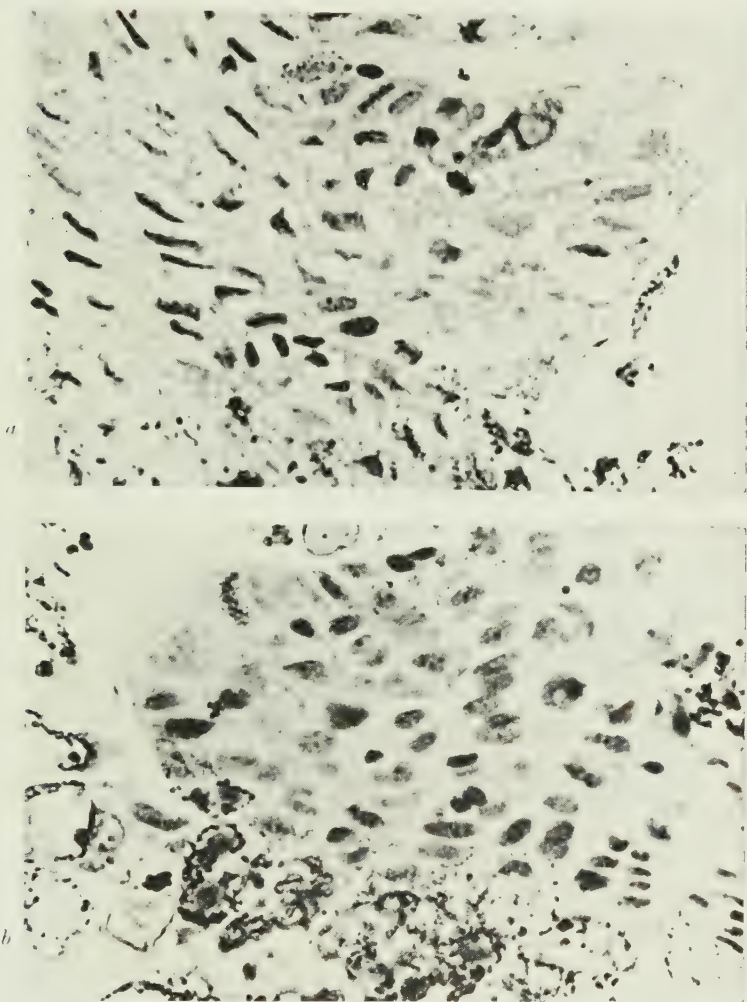


FIG. 85. — Coupes longitudinales axiales de l'apex principal (a) et d'un apex latéral (b) de sporophytes carencés en calcium (type 3). Helly-Feulgen ($\times 600$).

En a, la forme des noyaux est atypique ; certains sont pycnotiques.

En b, les noyaux, aux formes normales, sont plus chromophiles qu'au niveau de l'apex principal figuré en a et que ceux observés au niveau de l'apex latéral d'un sporophyte témoin (cf. fig. 76 b).

l'apex (tableau XLV). Les ébauches foliaires et radiculaires se développent immédiatement dans la région basale du cône apical, résultat de la faible extension de la zone d'élongation.

— *Des modifications de la structure cellulaire* : le cytoplasme des cellules méristématiques ne paraît pas aussi abondant que chez les témoins. Les

noyaux, aux formes souvent irrégulières, sont moins chromophiles. Certains sont pycnotiques (fig. 77 c). Les nucléoles sont petits et peu nombreux.

Les nécroses, abondantes dans tous les tissus différenciés, n'ont pas atteint le dernier entre-nœud du rhizome (fig. 80). Dans les parenchymes du rhizome principal, les tanins, l'amidon (fig. 78 c) et les lipides s'accroissent en abondance.

Il est intéressant de noter que les bourgeons latéraux placés à la base des jeunes feuilles proches de l'apex, vus en coupes longitudinales tangentielles, sont parfois nécrotiques (fig. 86). Il se forme un anneau de nécrose qui tend à isoler la pointe du

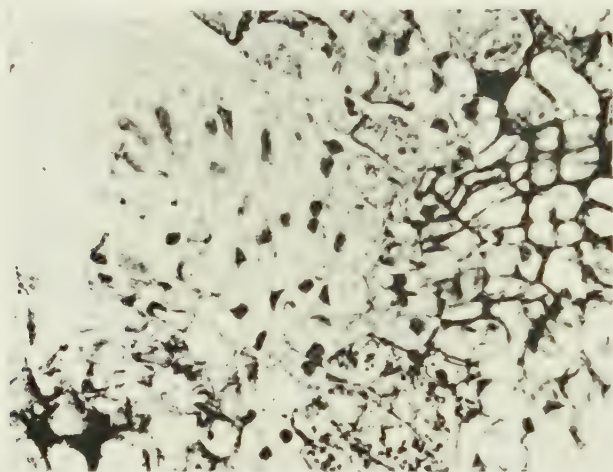


FIG. 86. — Coupe longitudinale tangentielle passant par un apex latéral proche de l'apex principal d'un sporophyte carencé en calcium (type 3). Helly-Feulgen ($\times 600$)

Les noyaux des cellules apicales présentent des formes aberrantes.

Les tissus placés sous le point végétatif proprement dit sont nécrosés

bourgeon des tissus sous-jacents. Cette formation est progressive et, lorsqu'elle est achevée, les noyaux de la pointe du méristème latéral sont fortement déformés et pycnotiques.

b. *Apex nécrotique*. — Il ne diffère pas de ceux observés sur des sporophytes moins ramifiés. Il est seulement plus petit. La présence de trachéides à $280\ \mu$ de la cellule apicale indique que, avant de mourir, les tissus se sont différenciés très rapidement.

L'imprégnation des parois par des substances brunes, l'autolyse du contenu cellulaire affectent plus ou moins tous les tissus du rhizome et des organes qu'il porte (feuilles, racines, bourgeons extra-axillaires encore à l'état d'ébauches).

II. APEX LATÉRAUX. — Les ramifications dont les apex ont été observés portaient de deux à huit feuilles secondaires, le plus souvent de forme juvénile, et ne mesuraient pas plus de quelques millimètres.

Les anomalies présentes au niveau de tels bourgeons sont similaires à celles déjà décrites : petitesse du cône apical, diminution de sa courbure, réduction extrêmement importante de la région subapicale, différenciation très précoce des cellules méristématiques, autolyse des éléments différenciés, modifications des métabolismes glucidique, phénolique et lipidique, nécroses épargnant les entre-nœuds les plus proches du point végétatif (cultures à apex chlorophylliens) ou envahissant tous les tissus, y compris les plus apicaux (cultures à apex nécrotiques).

Avant d'être complètement nécrosé, le point végétatif latéral comporte des cellules dont les noyaux sont riches en ADN et d'apparence interphasique (fig. 84 *b*, 85 *b* et 77 *d*).

EN RÉSUMÉ, en absence de calcium, la structure des apex principaux ou latéraux est très modifiée. Que les sporophytes soient peu ou très ramifiés, c'est-à-dire que l'absence de calcium se fasse plus ou moins sentir, les perturbations sont du même type : seule leur amplitude varie.

— Elles se traduisent, au niveau de l'apex principal, par la diminution de sa taille et par la différenciation beaucoup plus rapide de ses cellules. La région subapicale, où s'effectue l'élongation et l'élargissement du rhizome, est particulièrement affectée. L'absence de calcium, accélérant la différenciation, a pour résultat un raccourcissement de la région située entre la zone distale et la zone de maturation.

Au quarante-cinquième jour, les noyaux des apex principaux sont presque tous quiescents, alors que ceux des ramifications sont en majorité interphasiques. C'est à une conclusion diamétralement opposée que conduit l'observation des sporophytes témoins.

— La région subapicale très courte des axes latéraux n'est pas due à l'arrêt des divisions (comme c'est le cas dans les conditions normales), mais à la rapide différenciation des cellules issues de ces divisions.

— L'absence de calcium aboutit rapidement à la mort des cellules par nécrose. Le cytoplasme et les noyaux sont fortement lésés. Dans les cas les plus extrêmes, les cellules sont autolysées. La nécrose affecte aussi bien les rhizomes principaux que les ramifications, quel que soit l'aspect morphologique des cultures. Elle se propage dans le sens *acropète*, les tissus méristématiques de la pointe des axes restant les derniers vivants. Il est légitime de penser qu'elle gêne ou arrête complètement la migration des métabolites formés dans les tissus différenciés et qu'elle aboutit à mettre l'apex dans un état de carence trophique.

— Très rapidement, l'absence de calcium dévie de son cours normal le métabolisme cellulaire : nous l'avons au moins montré pour le métabolisme des glucides, des graisses et des tanins.

L'ensemble de ces observations valide l'hypothèse qui a été formulée au début de cette étude : *l'affaiblissement du pouvoir inhibiteur de l'apex terminal, déduit d'observations physiologiques, se vérifie histologiquement*. La présence de nécroses qui gagnent progressivement l'apex explique que

L'ALA, déjà en quantité insuffisante, ne puisse migrer vers les régions les plus âgées du sporophyte et contribue à faire comprendre que les

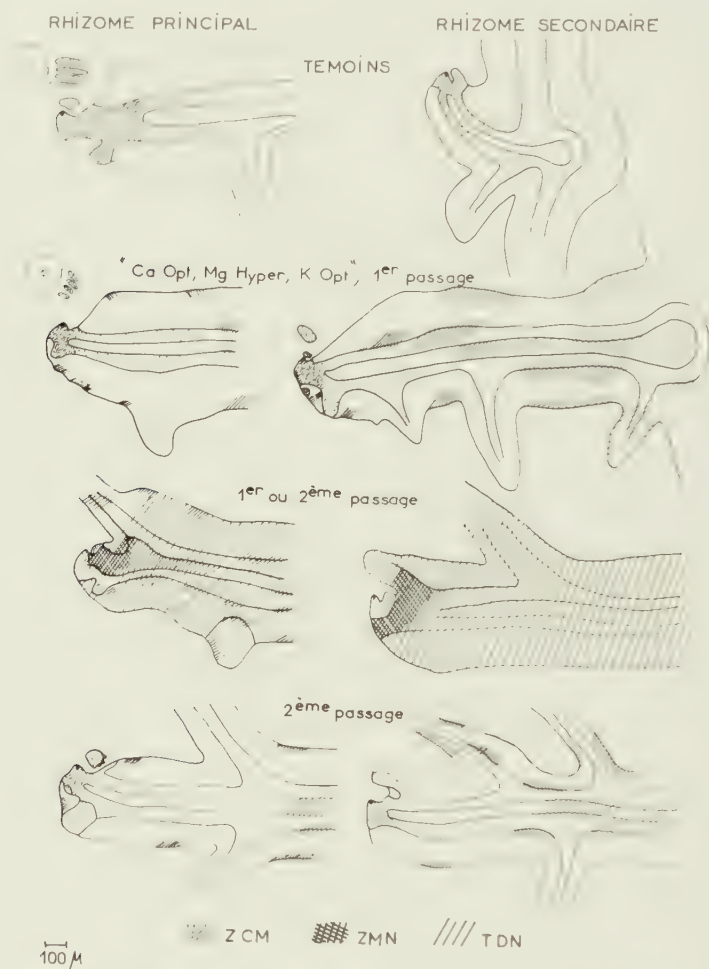


FIG. 87. — Coupes longitudinales axiales schématiques des apex principaux et latéraux de sporophytes cultivés sur le milieu à « Ca opt Mg hyper »

Mêmes légendes que celles de la figure 80.

ramifications les plus longues soient aussi celles qui sont les plus éloignées du bourgeon terminal.

La diminution du pouvoir inhibiteur des feuilles et des racines peut, là encore, s'expliquer par les lésions rapides qui les affectent, lésions si importantes qu'elles aboutissent à leur mort alors qu'elles sont encore à l'état d'ébauches.

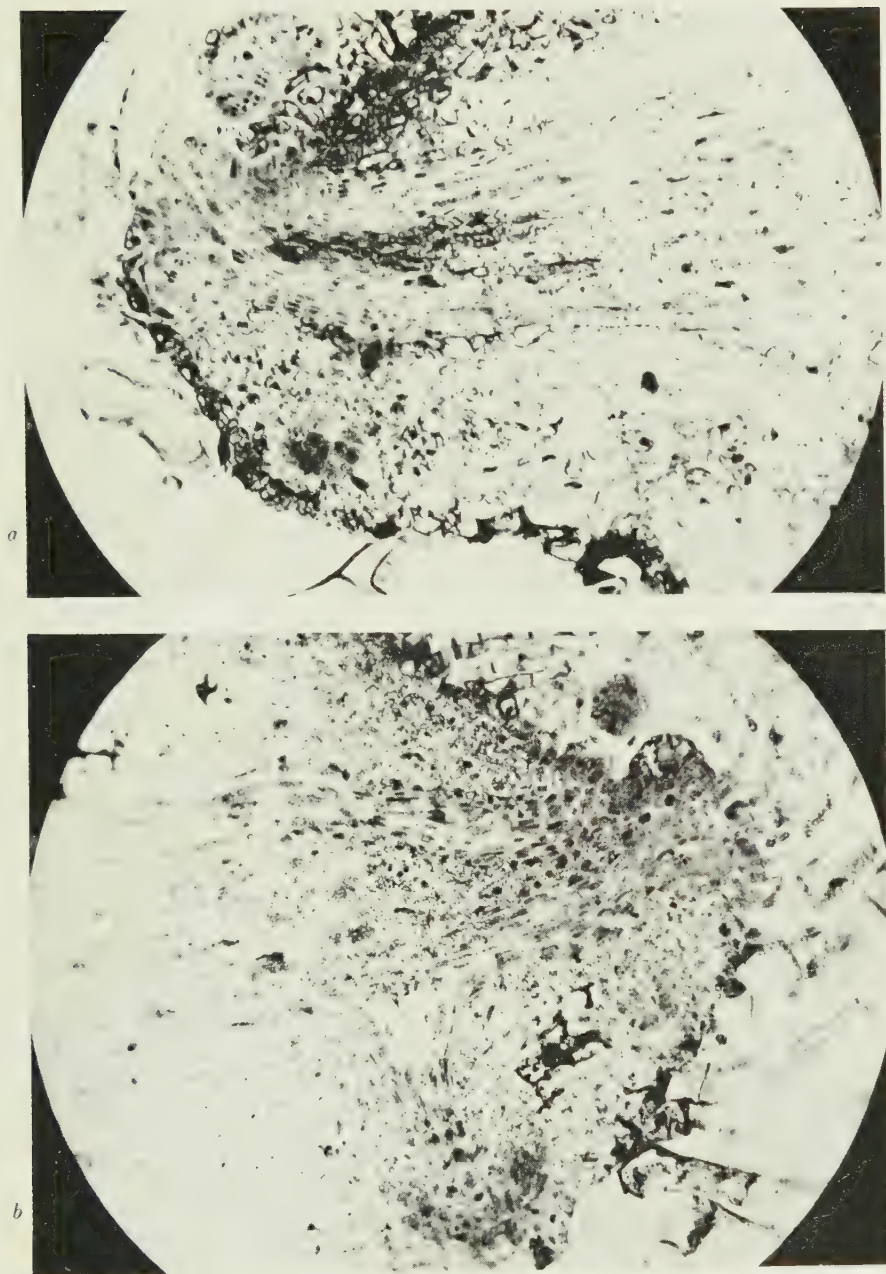


FIG. 88. — Coupes longitudinales axiales de l'apex principal (a) et d'un apex latéral (b) de sporophytes cultivés sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper » (cultures de 1^{er} passage). Helly-hématoxyline ($\times 200$).

Dans les deux cas, la différenciation des cellules est très précoce, la zone sub-apicale, réduite. Cependant, en b, les noyaux sont plus chromophiles qu'en a.

C. STRUCTURE DES APEX DES SPOROPHYTES CULTIVÉS SUR LE MILIEU
A « Ca opt Mg hyper K opt ».

1^o Sporophytes de premier passage. A la fin du premier passage, les apex sont le plus souvent chlorophylliens bien que les tissus de l'axe principal ou des axes latéraux soient très bruns.

I. APEX D'ASPECT SAIN (fig. 87). Les apex principaux ou latéraux

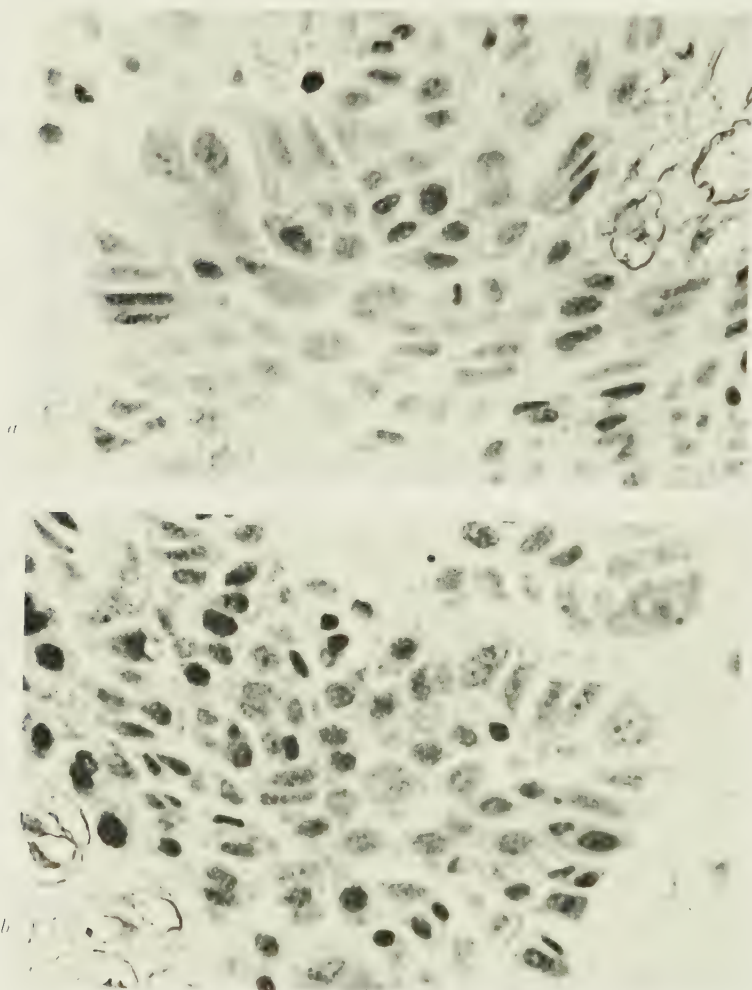


FIG. 89 — Coupes longitudinales axiales de l'apex principal (a) et d'un apex latéral (b) de sporophytes cultivés sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper » (cultures de 1^{er} passage). Helly-Feulgen ($\times 600$).

En a, les noyaux d'apparence interphasique sont moins nombreux qu'au niveau de l'apex principal d'un sporophyte témoin (cf. fig. 76 a).

En b, les noyaux sont plus chromophiles que ceux observés au niveau de l'apex principal d'un sporophyte traité (cf. a et b) et que ceux observés au niveau de l'apex latéral d'un sporophyte témoin (cf. fig. 76 b).

présentent le même ensemble de modifications de structure que celui décrit précédemment (carence calcique) : diminution de la courbure de la pointe de l'axe, réduction de la zone subapicale, métabolisme perturbé, nécroses des tissus différenciés (fig. 88 et 78 d).

Les noyaux des cellules méristématiques de l'apex principal sont souvent riches en ADN (fig. 89 a et 77 e) et les mitoses n'y sont pas rares. Cependant la proportion des noyaux quiescents est plus forte que chez les témoins. Au niveau du bourgeon latéral, les noyaux très chromophiles sont beaucoup plus nombreux (fig. 89 b et 77 f) : à la fin du premier passage, sur le milieu toxique, l'apex d'une ramification reste donc plus actif que celui du rhizome principal de la même culture et est beaucoup plus actif que le bourgeon latéral des témoins.

II. APEX NÉCROTIQUES (fig. 87). — Qu'ils soient principaux ou latéraux, ils ne diffèrent pas de ceux observés en cas de carence calcique : lésions importantes avec disparition plus ou moins totale de la cellule apicale et de ses voisines, nécroses de la zone subapicale, forte contraction du cytoplasme et noyaux aux formes atypiques, présence de trachéides tout près de la pointe de l'axe (tableau XLV).

2° *Sporophytes de deuxième passage.* — La taille des apex est réduite par rapport à celle des cultures de premier passage, ce qui indique que les mitoses ont été moins fréquentes. Cependant, les changements structuraux y sont identiques. La maturation des cellules est plus précoce encore.

Les noyaux les plus riches en ADN et les plus nombreux à être d'aspect interphasique s'observent au niveau des bourgeons latéraux.

Les apex nécrotiques ne diffèrent pas de ceux déjà décrits.

EN RÉSUMÉ, les modifications provoquées par un excès de magnésium dans un milieu qui contient, par ailleurs, une concentration optimale de calcium ne diffèrent pas notablement de celles causées par l'absence de calcium. Nous avons discuté en temps utile du rôle joué par le rapport Ca/Mg. Qu'il nous suffise de signaler que les conclusions établies alors sur des bases morphologiques et physiologiques sont vérifiées par l'étude histologique présentée ici.

*
* *

Quatre conclusions se dégagent de l'ensemble de ces observations :

1° Le point végétatif principal du sporophyte témoin comporte une zone organogène moins active que l'apex des cultures ramifiées, alors que la zone d'élongation y garde plus longtemps ses caractères méristématiques ; d'où sa grande étendue.

Dans les deux cas de nutrition défavorable, c'est le phénomène inverse que l'on observe : l'organogenèse foliaire (au moins au début du traite-

ment) est plus importante, en même temps que la zone sub-apicale reste peu développée par différenciation très précoce de ses cellules. En d'autres termes, un apex principal anormal se divise plus en vue de la formation des feuilles ; c'est la zone placée sous le point végétatif proprement dit (zone d'élongation) qui est moins riche en mitoses et qui, par ailleurs, subit une maturation plus précoce. De ce point de vue, il est essentiel de rappeler que, dans le cas des cultures aberrantes, les feuilles formées ne présentent pas leurs caractères normaux : elles sont toujours moins développées. Il est légitime de penser, à la suite des observations faites sur les très jeunes feuilles et les ébauches foliaires, qu'elles se différencient aussi plus rapidement, c'est-à-dire qu'elles ne gardent pas aussi longtemps que les témoins le capital méristématique nécessaire à l'accomplissement de leur croissance normale.

En fin de passage, lorsque le milieu nutritif a provoqué des désordres notables dans le métabolisme, les noyaux des apex expérimentaux sont peu riches en ADN et presque tous quiescents alors que, dans les conditions favorables, ils sont d'aspect interphasique et riches en ADN.

2° L'inhibition de croissance effectuée par l'apex principal sur les bourgeons placés sous lui ne s'exerce que lorsqu'ils ont ébauché leur développement, point particulièrement important puisqu'il montre que cette inhibition porte plus sur l'épanouissement que sur la formation du bourgeon. La croissance ultérieure des ramifications a donc lieu à partir d'organes normalement formés.

Au niveau des apex latéraux des sporophytes ramifiés, les noyaux, riches en ADN, ont des caractères nettement interphasiques alors que, dans les conditions normales, ils sont tous quiescents. Les bourgeons terminaux des rhizomes secondaires ont, comme les rhizomes principaux, une zone organogène très active en même temps qu'une zone subapicale réduite par maturation précoce des cellules, ce qui explique que la ramification reste courte.

3° La ramification du rhizome se produit alors que l'apex principal, affaibli, est encore vivant, contrairement à ce que supposent la plupart de nos prédécesseurs (KALRA [111]). Ceci, bien sûr, se vérifie sur les cultures dont l'apex est mort par nécrose, mais le fait d'avoir observé conjointement le développement des deux catégories de bourgeons est d'une importance capitale.

4° La zone subapicale, plus lésée par les désordres trophiques dus à la mauvaise nutrition que la zone organogène, doit être rendue responsable de la structure et de l'aspect morphologique des sporophytes anormaux.

**3^o De quelques modifications du métabolisme
des sporophytes ramifiés.**

Malgré leur caractère fragmentaire, les observations antérieures ont montré que les tissus des sporophytes ramifiés, comparés à ceux des témoins, sont moins hydratés et accumulent, dans des proportions importantes, de l'amidon, des lipides et des tanins. Il était donc intéressant de vérifier par un dosage précis les variations de la teneur en tanins dont nous avons constaté histologiquement l'augmentation et de compléter cette étude par le dosage des différentes fractions azotées.

Il n'a pas paru utile de doser l'amidon ni les lipides ; leur accumulation dans les tissus, mise en évidence par des méthodes appropriées, ne laisse en effet aucun doute.

A. — DOSAGE DES TANINS.

Le dosage des tanins a été effectué sur les tissus de vingt sporophytes cultivés sur chacun des milieux expérimentaux et sur le milieu témoin.

Les résultats (tableau XLVI) montrent que l'augmentation de la teneur en tanins est très sensible dans les tissus des cultures ramifiées, surtout

TABLEAU XLVI. — INFLUENCE DE LA COMPOSITION MINÉRALE DU MILIEU SUR LA
TENEUR EN TANINS DES TISSUS.

MILIEU.	TENEUR EN TANIN (en cm ³ de MnO ₄ K) pour 100 g de matière vivante.	POIDS FRAIS MOYEN d'un sporophyte (en mg).	RAPPORT DU POIDS sec au poids frais (valeur arrondie).
Témoin	562,5 100 %	382 100 %	$\frac{1}{8}$
Sans calcium (1 ^{er} passage)	775,3 138 %	393 103 %	$\frac{1}{6}$
« Ca opt/Mg hyper/ K opt » (1 ^{er} passage)	1 291,9 230 %	179 47 %	$\frac{1}{3}$

dans le cas où la croissance est très fortement inhibée (milieu à « Ca opt/Mg hyper »).

Il est, à cet égard, intéressant de constater que l'absence de calcium, bien qu'elle ne modifie pas l'accroissement pondéral des sporophytes de

premier passage, s'accompagne cependant d'une nette accumulation de tanin. En même temps, le rapport du poids sec au poids frais augmente.

Ces observations analytiques corroborent donc nos observations histo-chimiques. Elles permettent, en outre, de lier entre eux trois phénomènes différents : inhibition de croissance, déshydratation cellulaire, accumulation de tanins.

B. — DOSAGE DES FRACTIONS AZOTÉES.

Le dosage des différentes fractions azotées (tableau XLVII) a porté sur cent quarante-quatre sporophytes, en fonction de la composition saline de chacun des milieux étudiés. Les cultures ramifiées sont celles obtenues à la fin d'un premier passage.

TABLEAU XLVII. — INFLUENCE DE LA COMPOSITION MINÉRALE DU MILIEU SUR LA TENEUR EN AZOTE DES TISSUS.

MILIEU.	POIDS FRAIS moyen (en mg).	N RAPPORTÉ A 100 MG DE MATIÈRE VIVANTE.			
		N soluble total.	N nitrique.	N protéique.	N total (minéral + organique).
Témoin	248 100 %	0,112 100 %	0,0026 100 %	0,325 100 %	0,437 100 %
Sans calcium (1 ^{er} passage).....	338 136 %	0,111 101 %	0,0016 62 %	0,361 111 %	0,472 108 %
« Ca opt/Mg hyper/ K opt»..... (1 ^{er} passage).....	182 73 %	0,0581 52 %	0,0010 38 %	0,083 26 %	0,141 32 %

L'absence de calcium a provoqué exceptionnellement (cf. p. 216) une nette exaltation de croissance. Les cultures sont toutes de type 1 : les variations du métabolisme azoté en seront d'autant plus intéressantes.

1° La teneur en azote total des tissus carencés en calcium n'est pas sensiblement différente de celle des tissus normaux mais n'augmente pas proportionnellement à la croissance.

Sur le milieu à « Mg hyper », l'inhibition de croissance est concomitante d'une forte diminution du contenu azoté.

2° Dans les deux lots de cultures ramifiées, l'azote soluble varie suivant le même rapport que l'azote total, alors que l'azote nitrique est à un taux

beaucoup plus bas, que la croissance en quarante-cinq jours soit exaltée ou fortement diminuée.

Il est légitime de penser — étant donné les résultats fournis par les autres fractions azotées — que la diminution de la teneur en azote nitrique dosable ne provient pas d'un excès d'assimilation, mais plutôt d'une incapacité d'absorber ou de retenir les nitrates du milieu nutritif (1).

3^o L'exaltation de croissance au cours du premier passage, sur milieu carencé en calcium, ne s'accompagne pas d'une augmentation dans les mêmes proportions, du contenu en azote protéique. Dans le cas où elle est fortement diminuée, les résultats montrent une forte diminution de la synthèse protéique.

C. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

L'ensemble de ces observations permet d'envisager quelques hypothèses sur le métabolisme des cultures ramifiées.

La croissance est étroitement liée aux changements biochimiques qui ont lieu dans les tissus, et l'on peut affirmer que la diminution de croissance, lorsqu'elle est constatée, est le résultat de ces changements. N'avons-nous pas observé à deux reprises, en effet, que les modifications du métabolisme qui traduisent un ralentissement des phénomènes vitaux s'observent avant que la croissance ne soit inhibée ?

Dans tous les cas, la déshydratation des tissus, caractéristique d'une diminution de leur activité prolifératrice, s'explique en grande partie par un épaississement des membranes cellulaires (cf. observations histologiques) et par une accumulation de glucides (amidon) et de tanin. L'augmentation du taux des réserves glucidiques est très probablement un des facteurs qui conduit à la diminution de la teneur en azote protéique.

Les tissus normaux qui sont caractérisés par une croissance active présentent, au contraire, un abaissement du rapport poids sec/poids frais, ont un taux élevé d'azote protéique et n'accumulent que peu ou pas de réserves.

Dans le cas particulier de la carence calcique, l'augmentation de poids frais, parfois constatée, ne correspond pas à une activité physiologique exaltée (synthèse de protoplasme), mais à une élévation de la teneur en matières inertes (membranes, réserves, déchets) traduisant déjà un métabolisme pathologique.

(1) L'homogénéité et la petitesse des explantats ne permettent pas de penser que les réserves nitriques qui y sont présentes puissent expliquer, au bout de quarante-cinq jours, les variations du contenu en azote nitrique.

CONCLUSIONS ET CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

Au terme de l'exposé des résultats expérimentaux, il convient d'en dégager les points essentiels, de tenter de les confronter avec ceux de nos devanciers et d'évoquer les problèmes qu'ils soulèvent.

1^o Exposé des principaux résultats.

Étudier *in vitro* les effets de la nutrition minérale sur le sporophyte d'une Fougère impliquait le choix préalable d'un matériel végétal approprié à des investigations à la fois prolongées et exactes. Comme nous nous sommes efforcée de le montrer au début de ce travail (p. 176), les Fougères communes ne convenaient guère à cet égard. Au contraire, le sporophyte du *Marsilea drummondii* A. Br., espèce australienne, s'est révélé intéressant : par sa structure d'ensemble et par sa croissance rapide et homogène sur milieu aqueux, il est un sujet d'expérimentation favorable.

A. — RECHERCHES PRÉLIMINAIRES.

Les recherches préliminaires effectuées sur cette plante se sont développées suivant deux voies différentes : d'une part, ont été définis les caractères propres du sporophyte cultivé sur le milieu témoin (milieu de Knop dilué de son volume d'eau et additionné de 3 p. 100 de glucose); d'autre part, a été étudiée l'action de divers facteurs pouvant modifier son aspect morphologique et sa croissance.

1^o *L'étude des caractéristiques du sporophyte témoin* a été faite tant du point de vue qualitatif que quantitatif : degré de variabilité de l'accroissement pondéral, grandeur et nombre des divers organes (rhizome, feuilles, racines), structure anatomique du rhizome, aspect et degré d'épanouissement des feuilles.

Une attention particulière a constamment été apportée à l'hétérophylle de la plante : comme on le verra plus loin, c'est là un critère significatif de l'état physiologique du sporophyte, en particulier lorsque les conditions nutritives sont perturbées. Chez le témoin, sujet normal et sain (1), il n'y

(1) Au début de nos recherches, la souche sur laquelle étaient prélevés les explantats avait déjà subi deux passages consécutifs (espacés chacun de quarante-cinq jours) depuis la « germination » des spores du sporocarpe. Dans aucun cas nous n'avons fait porter les observations sur les jeunes plantules issues de la fécondation des « mégaspores ». Les caractères morphologiques de ces plantules sont en effet différents de ceux des sporophytes obtenus par multiplication végétative, notamment en ce qui concerne l'aspect des feuilles (cf. ALLSOPP).

a que des feuilles *quadrifides* : on les appellera feuilles « adultes » pour les distinguer des feuilles uni- ou bifides (feuilles « juvéniles »), observées normalement chez la très jeune plantule. Les feuilles adultes sont soit *palmées* (quatre folioles petites disposées dans des plans verticaux), soit *épanouies* (larges folioles disposées dans un plan horizontal). Ces dernières représentent le degré le plus avancé de différenciation et de développement foliaire.

2° L'examen préliminaire a, d'autre part, permis de déterminer avec précision les **conditions de culture** permettant d'obtenir et de contrôler le développement du sporophyte : *pH* du milieu témoin, effets sur la plante des ions accompagnateurs Na^+ et Cl^- obligatoirement introduits lorsque l'on fait varier les concentrations des principaux ions, influence du rythme saisonnier sur la morphologie du *Marsilea*, modification de sa croissance à mesure que le nombre des passages s'accroît, les valeurs pondérables « stables » étant obtenues à partir du deuxième ou du troisième passage.

Les caractères du sporophyte et les conditions techniques une fois connus, notre travail sur la nutrition minérale proprement dite a pu alors être abordé. Nous avons été conduite à modifier les concentrations des cations (Ca^{++} , Mg^{++} , K^+) et des anions (NO_3^- , SO_4^{--} , PO_4H_2^-) présents dans le milieu témoin. *Ces modifications ont porté sur un seul ion isolément des autres ou sur plusieurs ions conjointement.*

B. — MODIFICATIONS DES CARACTÈRES QUALITATIFS ET QUANTITATIFS DES SPOROPHYTES SOUS L'EFFET DE LA NUTRITION MINÉRALE.

1° Aspect morphologique du sporophyte. — Au cours de cette partie de notre travail, nous avons constaté que, lorsque les conditions nutritives sont modifiées, les sporophytes réagissent de deux manières différentes : ou bien ils ne présentent aucune altération structurale notable par comparaison avec les témoins et peuvent être qualifiés de sporophytes *normaux*, ou bien, au contraire, ils montrent des modifications morphologiques accentuées et doivent donc être considérés comme *aberrants*.

I. SPOROPHYTES NORMAUX. — Le sporophyte est dit normal lorsque par son aspect d'ensemble il rappelle le sporophyte témoin (fig. 4). Il comprend alors un rhizome étiré dont les nœuds sont espacés ; ses feuilles sont toutes quadrifides, les premières palmées, les suivantes épanouies. Tous ses organes sont chlorophylliens à l'exclusion des racines qui sont blanches et longues. Enfin — point capital — les bourgeons latéraux (extra-axillaires) placés à la base de chaque feuille ne se développent pas : ils sont à l'état *latent*.

Ce type de culture s'observe dans tous les cas où les concentrations individuelles ou conjointes en cations ou en anions sont modérées ou

faibles. Les limites inférieure et supérieure de ces concentrations sont d'ailleurs différentes suivant la nature de l'ion : elles correspondent *grosso modo* aux concentrations voisines de l'optimum pour le développement de la plante. En dehors d'elles, c'est-à-dire pour des concentrations très faibles ou, à l'opposé, élevées, celle-ci ne présente plus les normes définies ci-dessus : elle est donc à considérer comme atypique.

II. SPOROPHYTES ABERRANTS. — Les anomalies provoquées par la perturbation des conditions nutritives affectent tous les organes du sporophyte.

1° Le rhizome reste court de sorte que les nœuds qu'il porte sont très rapprochés.

2° Les feuilles sont nettement sous-développées.

Deux cas peuvent se présenter :

— Dans le premier, le plus fréquent, *les feuilles sont du type adulte* : c'est la réduction de taille des quatre folioles ou l'enroulement en crosse qui traduisent l'arrêt précoce de leur développement. Ce phénomène s'observe principalement lors de carence, d'insuffisance ou d'excès de l'un ou de plusieurs des macro-éléments étudiés.

— Dans le second cas, *les feuilles sont du type juvénile*, c'est-à-dire spatulées ou bifides. Ces formes juvéniles sont provoquées tout particulièrement par la carence ou l'excès de calcium, par l'excès de magnésium dans un milieu qui contient une quantité réduite ou optimale de calcium, ou encore par la carence en soufre. Une telle absence de feuilles quadrifides doit être considérée comme une régression du développement hétéroblastique normal. Elle représente la réaction la plus immédiatement visible que manifeste le sporophyte lorsqu'on le met dans des conditions nutritives qui ne lui conviennent pas.

3° Les racines sont toujours plus courtes que celles des plants normaux.

4° Nécroses et chloroses sont importantes dans tous les cas et affectent tous les organes du sporophyte.

Lorsque ces changements structuraux sont provoqués par la carence, ils se traduisent par des lésions qui aboutissent à plus ou moins brève échéance à la mort des cultures. Le potassium constitue une exception à cet égard : son absence ne conduit pas le *Marsilea* à la mort.

L'excès des macro-éléments provoque lui aussi, comme la carence, des lésions, mais celles-ci permettent à la plante de survivre. La sensibilité du sporophyte vis-à-vis des différents ions est d'ailleurs variable : une faible augmentation de la teneur des milieux en sulfates et en nitrates est préjudiciable à la croissance. Au contraire, celle-ci n'est guère affectée par de fortes augmentations de la teneur des milieux en phosphates ou

en magnésium. Ajoutons que la tolérance à l'égard de ce dernier élément est contrôlée par la teneur en calcium (nous reviendrons sur ce point ultérieurement).

L'étendue des anomalies nous a amenée à considérer comme *indispensables tous les éléments présents dans le milieu témoin*. Par des recherches complémentaires, nous avons pu préciser que l'azote fourni au sporophyte doit l'être sous sa forme nitrique, l'azote ammoniacal s'étant révélé très rapidement inapte à être la seule source d'azote.

5° Une modification particulièrement curieuse, et qui s'ajoute à celles décrites ci-dessus, a été provoquée par le calcium lorsqu'il est fourni à des doses anormales (carence, déficience ou excès). Le sporophyte présente des ramifications dues au développement des bourgeons latéraux du rhizome. Dans ce cas, les feuilles portées par ces axes sont toutes rudimentaires, et le plus souvent du type juvénile.

Le buissonnement du rhizome principal est plus constant et plus accentué en cas de carence et d'insuffisance qu'en cas d'excès. La comparaison des différents résultats obtenus sur ce point nous a conduite à supposer que, d'une manière générale, le calcium n'agit pas par lui-même, mais indirectement en perturbant le métabolisme général de la plante, et qu'il provoque la levée d'inhibition des bourgeons en altérant leur équilibre humoral. Cette double hypothèse a été examinée expérimentalement. Elle sera résumée plus loin.

L'étude des effets de la carence calcique a été complétée par quelques recherches subsidiaires. Dans une première série d'expériences, nous avons évalué l'importance, bien connue en physiologie, de l'équilibre entre cations bivalents, ce qui nous a amenée à soumettre le sporophyte de *M. d.* à une double carence en calcium et en magnésium; de même, dans une autre série avons-nous abaissé le taux de magnésium dans un milieu sans calcium. De cette manière, une discrimination a pu être faite dans les rôles respectifs des deux éléments: il est apparu que *l'absence de calcium doit être tenue pour principale responsable de la ramification des plants*; le rôle du magnésium est, à cet égard, secondaire.

C'est cette même teneur en calcium, de plus en plus réduite dans les tissus à mesure qu'augmente la durée de l'expérience, qui règle le degré de ramification de la plante: les dosages complexométriques montrent, en effet, que plus la carence est aiguë et plus l'aspect « buissonnant » du sporophyte est accentué. A ce stade, celui-ci se trouve alors dans un état d'hypersensibilité au moindre apport de calcium: aussi avons-nous montré qu'il suffit d'ajouter par litre 0,4 mg de calcium pour que les sporophytes carencés reprennent leur aspect normal. Une telle disproportion entre cause et effets indique que le calcium, dans ces plants aberrants, joue le rôle de facteur limitant.

2° *Croissance des sporophytes*. — Les observations morphologiques qui viennent d'être résumées ont été complétées par des examens quantitatifs

correspondants. Nous avons envisagé le développement du sporophyte successivement lorsque varie la concentration en un seul ion du milieu de référence, puis la concentration en plusieurs ions.

I. ACCROISSEMENT PONDÉRAL. — a. *Variation de la concentration en un seul ion.* — Les courbes représentatives des variations de l'accroissement pondéral en fonction de la teneur des milieux en un ion donné ont toutes la même allure. Ce sont des courbes à maximum : à mesure que le milieu s'enrichit en un élément, l'augmentation du poids du sporophyte s'accroît jusqu'à ce que soit atteint un maximum ; la structure de la plante est alors normale. Passé ce maximum, le poids des cultures diminue pour devenir très faible au niveau des doses excessives : par sa structure, la plante est alors aberrante. Comme on l'observe fréquemment au cours d'expériences de ce type, les courbes sont toutes dissymétriques : en effet, le poids augmente rapidement si l'apport en un macro-élément est faible ou moyen et subit une phase de chute lente aux teneurs plus élevées. Cela traduit de la part de la plante trois phases différentes : dans la zone des concentrations faibles ou moyennes, elle est très sensible à la moindre augmentation de la concentration en un élément ; son accroissement pondéral est alors directement lié à la quantité de macro-élément fourni par le milieu nutritif. Au-delà de l'optimum de concentration, la chute lente des courbes indique que la plante est dans un état de maintien pondéral plus ou moins long, et que sa réactivité vis-à-vis de l'ion tend à diminuer. Enfin, la dernière phase correspond à une suspension plus ou moins marquée de l'accroissement pondéral : l'apparition d'anomalies structurales traduit alors l'intoxication de la plante par l'ion en excès.

La comparaison des courbes obtenues s'est avérée fructueuse en ce sens qu'elle a permis de montrer avec précision les exigences nutritives du *Marsilea*. Ainsi, pour obtenir le maximum de croissance en quarante-cinq jours, il faut fournir moins de calcium et de sulfates qu'il ne s'en trouve dans le milieu témoin. Les doses de magnésium et de phosphates doivent être, au contraire, majorées. Enfin, il n'y a pas lieu de beaucoup modifier les quantités de nitrates et de potassium.

La sensibilité du sporophyte à l'égard des éléments étudiés s'est montrée différente suivant leur nature : ainsi, les ions SO_4^{--} sont rapidement mal tolérés lorsque leur teneur dans les milieux augmente ; une concentration de 0,75 mI/litre, soit à peine plus que celle du milieu témoin (0,51 mI), est déjà nettement toxique. A un degré moindre, les ions NO_3^- et Ca^{++} se comportent de même. D'autres éléments, au contraire, tels que le potassium, les phosphates et surtout le magnésium sont beaucoup mieux supportés à fortes doses. Ces observations corroborent celles qui ont été faites ci-dessus (p. 364).

b. *Variations simultanées de la concentration de plusieurs ions.* — Lorsque plusieurs anions, ou cations, varient simultanément, on constate qu'à

l'effet de chacun d'eux se superpose un effet supplémentaire dû aux interactions qui les lient entre eux.

Les relations entre cations sont nettes : un fort antagonisme se manifeste entre le calcium et le magnésium et, à un degré moindre, entre le potassium et le magnésium. L'interaction K/Ca est extrêmement faible.

L'interaction Ca/Mg, parce que souvent mentionnée dans la littérature, a fait l'objet de recherches particulières. De l'ensemble de celles-ci, il ressort que les relations existant entre les deux ions positifs ont une importance physiologique incontestable, mais leur mode d'action, dans le cas du *Marsilea*, semble un peu différent de celui que l'on rapporte généralement pour d'autres espèces végétales.

En effet, pour cette Fougère, il faut avant tout prendre en considération non pas les *valeurs relatives* de la concentration en Ca^{++} et en Mg^{++} , mais surtout leurs *valeurs absolues* dans le milieu nutritif. Autrement dit, la grandeur du rapport Ca/Mg importe peu tant que la quantité de ces deux éléments est suffisante pour assurer le développement normal de la plante. La toxicité d'un élément ne peut se manifester que si la *concentration absolue* de l'autre est trop faible pour exercer son action antagoniste. On trouvera dans le texte (notamment p. 289) quelques exemples de milieux dont les effets illustrent une telle conclusion.

Enfin, l'étude des interactions cationiques nous a permis de définir un certain nombre de combinaisons contenant des concentrations en K^+ , Ca^{++} et Mg^{++} propres à assurer la croissance maximale du sporophyte.

Les *interactions anioniques* n'ont pas fourni de résultats aussi nets. Dans les divers milieux considérés, chacun des anions étudiés (NO_3^- , SO_4^{--} , PO_4H_2^-) agit pour son propre compte sans être notablement influencé par les deux autres anions qui l'accompagnent : *les interactions, ici, sont donc faibles ou nulles.*

Cependant, l'existence de quelques interactions a permis de déterminer les combinaisons anioniques qui permettent la meilleure croissance du *M. d.*

L'ensemble des résultats précédents a permis de grouper entre elles les combinaisons cationiques et anioniques les plus favorables à la croissance, et de proposer ainsi, au terme de cette partie de notre travail, *un milieu amélioré par rapport au milieu témoin*. Sa composition est donnée page 302 : on remarque que, par rapport à ce dernier, il est moins riche en calcium et en sulfates, mais comprend des phosphates en quantité plus importante. L'usage de ce milieu apparaît appréciable lorsque l'on désire disposer de sporophytes de *Marsilea* de grandes dimensions : pour un poids frais de 100 g sur le milieu témoin, ce milieu amélioré fournit environ 180 g. Des observations complémentaires (anatomiques, histochimiques et analytiques) nous ont permis de conclure que cette augmentation pondérale est réelle : elle traduit en effet un accroissement du protoplasme et non une accumulation de nature paraplasmique.

II. AUTRES CARACTÈRES QUANTITATIFS. — Les recherches précédentes de caractère global (accroissement pondéral de l'ensemble des cultures) ont été complétées par des mesures effectuées sur les divers organes constitutifs de ces mêmes cultures. Des nombreuses données quantitatives ainsi recueillies se dégagent divers points intéressants en ce qu'ils précisent ou mettent en évidence des phénomènes que les observations précédentes n'avaient pu apporter. On constate, tout d'abord, que dans leur ensemble les variations de la taille ou du nombre des divers organes ne sont pas indépendantes les unes des autres : une corrélation étroite existe entre elles. En effet, les conditions nutritives imposées ne modifient pas tel ou tel caractère sporophytique isolément des autres, mais tous pris dans leur ensemble. Cependant, si l'on examine en détail les données numériques qui appuient cette conclusion d'ordre général, on décèle des particularités de comportement que le simple examen morphologique et la détermination du poids frais ne peuvent fournir : une séparation doit être faite notamment entre la fréquence de formation des organes foliaires et radiculaires et leur *élongation ultérieure*. Ainsi, lorsque les conditions sont défectueuses, la fréquence est moins diminuée que l'élongation. De même, sur les milieux optimaux, l'allongement des organes est plus exalté que leur formation. *Exprimés en terme de morphogénèse, ces deux processus montrent que le pouvoir organogène du bourgeon terminal est moins sensible aux effets de la nutrition minérale que le pouvoir d'élongation et de croissance des organes qu'il forme.* Ce point a été vérifié ultérieurement. A cet égard, il convient de noter que l'effet de la carence en un élément sur l'initiation foliaire n'est pas le même suivant sa nature : les feuilles formées en quarante-cinq jours sont aussi nombreuses que chez les témoins lorsque le milieu est dépourvu de soufre ; leur nombre est très diminué si le potassium, le phosphore, l'azote ou le magnésium sont absents. Là encore, comme pour la morphologie, le calcium agit de façon particulière : il est le seul élément dont l'absence ou l'insuffisance se traduisent par une exaltation de la formation des feuilles (1).

3^o *Structure anatomique du rhizome.* — Les modifications de l'aspect et du poids de la plante s'accompagnent de changements structuraux à l'échelle anatomique. Deux voies différentes ont été adoptées pour déterminer ces changements de la structure du rhizome lorsque varie la composition saline du milieu nutritif : d'une part, l'observation a porté sur un seul et même niveau de l'axe principal (coupes faites au quatrième entre-nœud visible à l'œil nu, compté à partir de l'apex) ; d'autre part, elle s'est attachée à suivre les modifications qui affectent le rhizome au cours de son développement (examen de coupes pratiquées au niveau des six premiers entre-nœuds les plus jeunes).

I. OBSERVATIONS DE COUPES EFFECTUÉES AU NIVEAU DU QUATRIÈME ENTRE-NŒUD. — Deux points essentiels ressortent de cette étude :

(1) Seul est considéré ici le nombre des feuilles produites par le bourgeon terminal.

— *Les carences en un élément*, anion ou cation, modifient à un degré plus fort que les doses excessives la configuration structurale de l'axe.

— *Seules les concentrations toxiques en cations* sont susceptibles d'altérer la structure du rhizome. Les excès d'anions ne produisent pas de changements notables. Il apparaît donc que les caractères anatomiques du sporophyte (caractères internes) sont plus stables que les caractères extérieurs globaux (puisque, dans ce cas, les cultures sont toutes de type aberrant).

Analysées de façon plus détaillée, les modifications légères observées en cas d'excès d'anions portent plus sur une réduction de taille du rhizome et de sa stèle que sur sa structure. La carence en K a les mêmes effets. Dans tous les autres cas de carence, le rhizome présente un ensemble de changements typiques : réduction du diamètre de l'axe, réduction des lacunes aérifères, présence de cellules parenchymateuses de taille anormale, hypertrophie des cellules endodermiques, épaississement cellulosique (en général) ou sclérifié des parois cellulaires des parenchymes corticaux ou médullaires, diminution du calibre des trachéides accompagnée, soit de l'augmentation de leur nombre (carences en azote et en phosphore), soit de leur réduction (carences en calcium, magnésium et soufre).

Les modifications qui affectent la moelle sont de deux sortes : soit une hypertrophie médullaire (excès de magnésium et d'ions ammoniacaux), soit une réduction aboutissant parfois à sa disparition totale (absence, insuffisance ou excès de calcium, carences en magnésium et en soufre). *Le passage progressif de la solénostèle amphiphloïque à la protostèle médullée* qui constitue la plus profonde des anomalies anatomiques observées est concomitante du passage des feuilles quadrifides (quel que soit le degré de développement des folioles) aux feuilles juvéniles, bifides ou spatulées. Ainsi, dans tous les cas de régression du développement hétéroblastique, on observe une diminution de la complexité stélisque.

En plus de ces modifications, il faut noter qu'à maintes occasions des troubles de la lignification des trachéides ont été observés qui, là encore, sont provoqués par des carences ou des déséquilibres cationiques, et non anioniques (absence ou excès de magnésium, insuffisance ou excès de calcium). L'apparition de tels troubles n'a aucun lien avec la fréquence de formation des trachéides, ni avec le moment de leur apparition : celles-ci, en effet, peuvent être plus nombreuses que chez les plants normaux (excès de Mg^{++}) ou en nombre très réduit (carence en Mg^{++} ou excès d'ions Ca^{++}).

II. OBSERVATIONS DE COUPES PRATIQUÉES AU NIVEAU DES SIX PREMIERS ENTRE-ŒUDS DU RHIZOME. — La comparaison des coupes effectuées à divers niveaux de l'axe principal a permis de constater que les trachéides ont achevé leur différenciation plus précocement (au niveau du deuxième entre-nœud) chez les sporophytes carencés que chez les témoins (quatrième

entre-nœud). Les excès n'occasionnent guère de troubles à cet égard : les éléments du xylème sont formés de façon normale.

C. — ÉTUDE DES SPOROPHYTES RAMIFIÉS.

Il a été déjà signalé (p. 194) que, dans les conditions nutritives favorables, les bourgeons latéraux du rhizome se trouvent à l'état *latent*. Sur certains milieux déséquilibrés cependant, ils peuvent entrer en activité et produire le buissonnement de la culture par formation d'axes latéraux. Ce phénomène, qui traduit la levée de la dominance apicale à laquelle on assigne une nature hormonale, nous a paru mériter quelques recherches particulières. Celles-ci ont été de trois sortes : *analytiques, physiologiques et histologiques*. Elles exigeaient, pour être menées à bien, des sporophytes très ramifiés, présentant constamment les mêmes anomalies structurales et susceptibles de subir plusieurs repiquages sans mourir. Ceux cultivés sans calcium (p. 210) et sur le milieu à « Ca opt/Mg hyper/K opt » (p. 283) convenaient à cet égard. D'autres milieux, au contraire, ont été éliminés : milieux à « Ca hypo/Mg hyper » (p. 280) sur lesquels les plants meurent au cours du premier passage et milieu contenant un excès de calcium (p. 226) (ramification épisodique).

LA PREMIÈRE DÉMARCHÉ tentée a consisté à déterminer, par les méthodes chromatographiques et les tests biologiques usuels (test Avoine de Bonner), le contenu hormonal des sporophytes ramifiés, d'une part, et des sporophytes témoins, d'autre part.

Dans les deux cas, la fraction acide des extraits, qui contient les auxines dites libres, présente deux substances actives : l'une est l'acide indol- β -acétique (AIA); l'autre, que nous avons appelée l'activateur A, est de nature chimique inconnue : c'est un composé acide fréquemment mentionné dans la bibliographie.

Ainsi, qualitativement, le contenu auxinique des deux types de cultures est identique. Mais quantitativement, il n'en est plus de même. En effet, les deux « auxines » décelées sont toujours plus actives et se trouvent en quantité plus grande dans les tissus des sporophytes normaux que dans ceux des sporophytes ramifiés. D'où la conclusion que *le buissonnement des cultures est toujours lié à la diminution du taux de l'AIA et de l'activateur A, diminution pouvant aller jusqu'à la disparition totale*.

Aucune liaison n'a pu, par ailleurs, être établie entre le développement des bourgeons latéraux et l'absence ou l'insuffisance d'un éventuel inhibiteur qui eût été spécifique du sporophyte témoin, et à la présence duquel aurait été attribuée l'inhibition des bourgeons qui s'observe chez lui. Ce résultat négatif établi sur le test Avoine classique, c'est-à-dire sur une espèce végétale différente du *Marsilea*, a été confirmé par celui qu'a fourni un autre test que nous avons été amenée à mettre au point : « le test *Marsilea* », basé sur la mesure des modifications morphologiques et

pondérales du sporophyte de *M. d.* mis en contact avec les extraits acides obtenus à partir des pieds de la même espèce, normaux ou ramifiés : c'est là, en quelque sorte, un « auto-test ». Ce test, plus sensible par certains côtés que le test Avoine, a décelé la présence d'un fort inhibiteur de croissance : toutefois, le fait qu'il soit commun aux plants normaux et aux plants aberrants exclut son intervention dans les phénomènes de ramification.

Dans ces conditions, NOTRE TRAVAIL A ÉTÉ ORIENTÉ VERS L'ÉTUDE DU RÔLE DE L'AIA, à défaut de celui de l'activateur A, chimiquement non défini.

Deux directions ont été suivies à cet égard : l'une a consisté à observer les effets de l'AIA synthétique sur des cultures déjà ramifiées, l'autre à essayer de provoquer la ramification des sporophytes témoins en les cultivant sur des milieux contenant des corps supposés être des antiauxines.

— L'observation a alors montré que l'AIA diminue très notablement le buissonnement des sporophytes ramifiés sans toutefois l'empêcher complètement.

— Il est apparu, d'autre part, que les substances connues comme aptes à modifier ou à bloquer l'AIA endogène des tissus ne provoquent pas la levée de la dominance apicale, c'est-à-dire le développement des bourgeons latéraux.

Dans les deux cas, la conclusion est la même : l'AIA, s'il intervient dans le phénomène de la ramification, ne peut à lui seul en être rendu responsable. Sans doute l'activateur A, décelé en même temps que l'AIA, intervient-il conjointement avec ce dernier.

D'autres causes doivent donc être envisagées : en effet, il a été possible de constater, à la suite d'expériences appropriées, que les feuilles et les racines, ensemble ou isolément, sont capables d'inhiber le bourgeon auquel elles sont associées, pourvu que, toutefois, le bourgeon terminal soit intact. Dans le cas contraire, ni les feuilles, ni les racines n'assument cette fonction d'inhibiteurs. Il apparaît donc que c'est à l'apex principal qu'il faille attribuer le rôle essentiel dans l'inhibition des bourgeons latéraux ; à cela s'ajoute le faible, quoique réel, pouvoir inhibiteur des feuilles et des racines.

DE TELLES OBSERVATIONS supposaient donc un fonctionnement anormal des tissus responsables des processus d'inhibition. Les expériences exposées ci-dessus permettaient d'en affirmer la validité d'un point de vue physiologique. Mais il fallait le confirmer par des examens morphologiques ou histologiques.

Pour les feuilles et les racines portées par le rhizome des plants ramifiés, la réponse est nette : toutes sont fortement sous-développées et montrent des nécroses aiguës. On comprend, dès lors, qu'elles ne soient plus aptes à former ou à fournir les substances morphogènes qui, normalement, renforcent l'inhibition apicale des bourgeons principaux.

En ce qui concerne l'apex, des observations histologiques ont été nécessaires pour essayer de vérifier notre hypothèse. Elles ont porté sur les points végétatifs principaux et latéraux prélevés sur des sporophytes témoins et des sporophytes ramifiés.

Les divers résultats obtenus ont permis de comprendre le mécanisme de la ramification des cultures :

— L'examen de la zone apicale montre que, dans les conditions nutritives normales, les bourgeons sont initiés très tôt et qu'ils se différencient rapidement. Ils sont donc potentiellement aptes à entrer en activité et à produire la ramification de la culture. Celle-ci n'a cependant pas lieu, par suite de l'inhibition exercée par l'apex, les racines et les feuilles. Chez les sporophytes aberrants, on retrouve les mêmes bourgeons à initiation aussi précoce, mais leur entrée en activité n'est plus inhibée.

Dans les deux cas, donc, l'origine de la ramification — *potentielle* dans les conditions normales, *effective* dans les conditions défavorables — est la même : elle est due à l'édification, puis au fonctionnement de bourgeons en tous points comparables. D'autre part, les facteurs humoraux qui règlent leur inhibition sont de même nature : ils ne diffèrent que quantitativement et non qualitativement (résultat fourni par les recherches chromatographiques).

— Lorsque les cultures sont soumises à une nutrition défectueuse, les tissus déjà différenciés de l'axe principal, situés un peu au-dessous du point végétatif, commencent à perdre leur intégrité : les parois des cellules s'épaississent et montrent un brunissement de plus en plus accentué ; leur capacité d'échanges est sans doute perturbée. C'est dès ce moment que s'ébauche la ramification. Ainsi, la levée de la dominance apicale précède-t-elle la mort du point végétatif : elle est concomitante des lésions qui affectent les tissus différenciés placés sous l'apex (1).

— Les coupes pratiquées à l'apex des cultures aberrantes montrent cependant que, si cet apex n'est pas mort, il est profondément modifié. Toujours de petite taille, il comporte une zone méristématique considérablement réduite par suite d'une maturation très précoce de ses cellules. Très généralement, celles-ci montrent un contenu anormal : noyaux peu chromophiles, pauvres en acide desoxyribonucléique, parfois pyknotiques, cytoplasme contracté, autolyse fréquente du protoplasme. En outre, à ce niveau où l'organogenèse ne fait que s'esquisser, les jeunes ébauches foliaires et radiculaires apparaissent déjà lésées par d'importantes nécroses de leurs tissus. Ainsi s'explique l'aspect anormal des feuilles et des racines peu développées, noté plus haut.

Les observations précédentes apportent suffisamment d'éléments pour

(1) Il est important de souligner ce point : en effet, expérimentant sur des plants de Tomate carencés en calcium, KALRA [111] explique la formation de tiges latérales par la mort prématurée de l'apex principal qui, chez ce végétal, est le premier à se nécroser. Chez le *Marsilea*, la nécrose est acropète et ne touche qu'en dernier les méristèmes caulinaux principaux. Les expériences relatées pages 224 et 291 en ont fourni la preuve : remis dans des conditions nutritives favorables, ces apex redonnent des plants normaux.

nous permettre maintenant de décrire ce que sont les phases successives des processus qui aboutissent à l'édification de la culture ramifiée.

Lorsque le sporophyte est placé dans de mauvaises conditions nutritives, les bourgeons latéraux, dont l'activité est latente chez les témoins, se dégagent de l'influence de l'apex et entrent en fonctionnement ; en même temps, les plages de nécrose commencent à apparaître au niveau des tissus les plus différenciés. A mesure que les effets de la nutrition déficiente s'accroissent, cette nécrose progresse peu à peu en direction du point végétatif. Aussi l'apex du sporophyte se trouve-t-il isolé du reste de la plante par l'établissement de zones nécrotiques formant barrière. Son approvisionnement en métabolites nécessaires à son activité normale est freiné. En outre, comme des dosages ou des mises en évidence histo-chimiques le montrent, la production de ces métabolites est elle-même perturbée (composés azotés, lipides, amidon, tanins). Cette désorganisation générale des tissus ne tarde pas à affecter la zone apicale avec les primordiums foliaires et radiculaires qu'elle comprend.

On s'explique alors, puisque l'on sait que c'est là que sont élaborés beaucoup de facteurs hormonaux dont l'AIA, que les lésions histologiques qui touchent l'apex ainsi que les zones sous-jacentes atténuent ou arrêtent la production ou la circulation basipète de tels facteurs. La conséquence en est la levée de la dominance apicale.

*
* *

En marge de ces recherches, d'autres points ont été précisés dont les résultats corroborent les conclusions précédentes. Ainsi, à la suite d'un examen des noyaux des cellules méristématiques, une étroite relation a été décelée entre le métabolisme de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et le mode de développement des bourgeons.

Dans le sporophyte normal, l'apex principal est toujours riche en ADN : les noyaux sont tous d'apparence interphasique. Les bourgeons latéraux inhibés montrent des noyaux pauvres en ADN et tous à l'état quiescent.

Dans les cultures ramifiées, c'est l'inverse qui est observé : libérés de la contrainte de l'apex terminal sous-développé, les bourgeons latéraux présentent des noyaux en interphase. Par contre, les noyaux de l'apex principal renferment une faible teneur en ADN et sont parfois pyknotiques. Ainsi, à l'échelle caryologique, de profondes différences existent entre un apex à fort pouvoir inhibiteur dont le fonctionnement assure la formation de la plante normale et un apex à pouvoir inhibiteur atténué dont la croissance est amoindrie à la suite de son sous-développement. Cependant, les anomalies qui viennent d'être décrites n'entraînent pas une diminution du pouvoir organogène de ces apex affaiblis et anormaux : ils produisent en effet plus d'ébauches foliaires que dans les conditions favorables. On se trouve ainsi conduit à souligner les deux points suivants :

1° La zone organogène d'un bourgeon terminal peut rester très active, alors que sa zone sub-apicale — zone d'élongation — se trouve très réduite par maturation très précoce de ses cellules.

2° Un apex peut produire des ébauches foliaires en nombre accru, mais celles-ci ne parviendront pas obligatoirement à maturité.

On retrouve là un résultat déjà fourni par l'étude des caractères quantitatifs du sporophyte (p. 368).

Ainsi, de l'ensemble des observations faites pour tenter d'élucider le déterminisme de la ramification des cultures, un point se dégage avec netteté : l'importance essentielle de la région apicale. Que son fonctionnement vienne à être perturbé — et c'est ce qui peut être provoqué *in vitro* par une modification appropriée de la nutrition minérale — aussitôt son rôle régulateur s'atténue ou s'annule. Les autres bourgeons, qui deviennent alors plus ou moins autonomes par rapport à l'apex, évoluent pour leur propre compte. Il y a plusieurs centres d'activité physiologique alors que, dans la culture normale, cette activité est presque entièrement l'apanage de l'apex principal.

2° Commentaires généraux.

Après avoir présenté les résultats essentiels de notre travail, il convient de les comparer à ceux de nos prédécesseurs. Il a paru souhaitable de suivre, pour l'exposé des réflexions générales suggérées par cette confrontation, le plan adopté pour l'exposé des principaux faits expérimentaux.

A. — CONSIDÉRATIONS SUR L'ASPECT MORPHOLOGIQUE DU SPOROPHYTE

1° *Nous avons vu que le sporophyte du Marsilea peut être normal ou aberrant.* L'appartenance à l'un ou l'autre de ces types morphologiques est contrôlée par les conditions nutritives imposées à la plante.

Quelques auteurs ont rapporté ce fait avant nous sur d'autres espèces de Fougères. Mais leurs indications sont souvent fragmentaires, ou exclusivement descriptives, et se rapportent à l'ensemble de la plante considérée globalement. Nos recherches, à la fois qualitatives et quantitatives, se sont efforcées d'apporter dans ce domaine des renseignements plus complets. D'une part, ayant été effectuées dans des conditions expérimentales aussi rigoureusement contrôlées que possible, elles ont fourni des résultats précis et susceptibles d'être développés ultérieurement ; d'autre part, ayant porté sur les divers organes du sporophyte (rhizome, feuilles, racines) elles ont permis de connaître la part de chacun d'eux sur le développement de la plante.

2^o *Une place importante a toujours été accordée à la feuille* en tant qu'organe révélateur de l'état physiologique de l'ensemble du sporophyte.

Certes, le recours au « diagnostic foliaire » est connu depuis longtemps, notamment en agronomie. Mais il faut insister sur sa valeur lorsqu'il s'agit d'une plante à développement hétéroblastique, comme c'est le cas du *Marsilea*. Sur cette Fougère, en effet, deux processus différents peuvent être suivis : d'une part, l'hétérophyllie naturelle liée au développement de la plante depuis le sporocarpe jusqu'à l'état adulte ; d'autre part, l'hétérophyllie provoquée par divers facteurs externes.

— Le premier point mérite peu de commentaires. Il n'est pas particulier au *Marsilea*, et l'on connaît de nombreux Végétaux présentant des formes foliaires différentes suivant qu'ils sont plantules ou pieds adultes (*Ipomea*, *Chelidonium*, *Potentilla*...).

Chez le *Marsilea*, on observe la séquence suivante : feuille aciculée, feuilles spatulées, feuilles bifides, feuilles quadrifides palmées, feuilles quadrifides épanouies.

— L'hétérophyllie provoquée expérimentalement nous intéresse plus particulièrement : en effet, les cultures de *M. d.* utilisées dans cette étude sont toutes issues d'explantats prélevés sur des organismes « adultes ». Chaque explantat ne peut être qualifié de « jeune » au sens où est jeune la plantule provenant du sporocarpe. Cela se traduit précisément par la nature des feuilles formées sur le sporophyte issu de tels fragments : la première feuille formée n'est ni aciculée, ni spatulée, ni bifide, mais d'emblée quadrifide palmée. Autrement dit, les sporophytes cultivés *in vitro*, même s'ils sont apparemment « jeunes », par rapport au jour du repiquage, sont, en fait, physiologiquement « adultes ». Mais, lorsque la plante se trouve dans un état physiologique anormal, on peut cependant observer un retour à ces différents stades : la carence en calcium, en soufre, par exemple, se traduit par la prolifération de feuilles bifides ou spatulées. Il faut alors noter, bien que les résultats obtenus ne permettent pas d'en connaître le mécanisme, que l'ordre inverse de succession des feuilles apparues est respecté : ainsi une feuille spatulée ne se développe pas immédiatement après une feuille quadrifide palmée. Entre elles, s'intercalent nécessairement une ou quelques feuilles bifides. De même, si les conditions nutritives redeviennent meilleures, après une feuille bifide (par exemple), on observera toujours une ou quelques feuilles quadrifides palmées avant que n'apparaisse une feuille quadrifide épanouie. La figure 41 illustre un tel processus.

Une telle régression foliaire a déjà été obtenue par nos prédécesseurs, à la suite d'expérimentations sur des Ptéridophytes ou des Végétaux supérieurs. Elle peut être provoquée par d'autres facteurs que la nutrition minérale. Des modifications de la nutrition glucidique [7, 8, 12, 188, 223, 224], l'adjonction au milieu de culture de substances de croissance synthétiques [6, 10, 13, 147, 160, 183], des variations de l'intensité ou de la durée de l'éclairement, de la température [31, 76, 84, 206, 207, 208, 230],

la mise en inanition des plants expérimentés [6, 88, 119, 199], des défoliations appropriées [19, 86, 109, 209] perturbent le développement hétéroblastique normal.

Ainsi, la forme de la feuille apparaît être un critère de grande sensibilité pour l'appréciation de l'état physiologique du sporophyte. Elle nous renseigne aussi sur un autre point : l'atténuation de la réactivité des sporophytes cultivés aseptiquement vis-à-vis des conditions de culture. Si l'on compare, en effet, les plantules issues du sporocarpe (ALLSOPP) et nos sporophytes provenant d'un explantat, on constate que le retour à la juvénilité foliaire est beaucoup plus fréquent et plus facilement atteint avec les premières qu'avec les secondes. Un changement de composition du milieu nutritif léger ou peu durable permet à ALLSOPP d'observer l'apparition de feuilles du type juvénile : dans notre cas, au contraire, ce résultat n'est obtenu qu'à la suite de déséquilibres nutritifs graves et prolongés. Il faut aussi remarquer qu'il se limite à quelques milieux très précis. Il apparaît donc que les sporophytes issus d'un explantat « physiologiquement adulte » sont beaucoup moins sensibles aux mauvaises conditions nutritives que ceux issus de la fécondation des mégaspores. Il faut peut-être voir dans ce phénomène une vérification de la théorie du vieillissement de KRENCKE [18 et 116] selon laquelle le degré de développement des feuilles mesure « l'âge physiologique » de la plante. Ne peut-on alors supposer que, dans les plantules expérimentées par ALLSOPP, les systèmes métaboliques des régions en voie de croissance se trouvent dans un état instable propre aux organismes « jeunes » selon leur « âge physiologique », alors que dans nos sporophytes « adultes » dès l'explantat, cette instabilité a fait place à un équilibre que seuls des changements externes brutaux (carences, excès, déséquilibres ioniques) peuvent perturber ? Seules des expériences précises permettraient de vérifier une telle hypothèse.

3° Cependant, un fait ressort très nettement de nos observations : lorsque les conditions nutritives sont très mauvaises, on observe un retour à l'état juvénile (feuilles bifides et spatulées) ou, lorsque les perturbations provoquées sont moins fortes, à un arrêt plus ou moins complet du développement des feuilles « adultes » (feuilles quadrifides palmées, enroulées en crosse ou à l'état d'ébauches).

A quoi attribuer une telle insuffisance de développement ?

Avant de proposer une réponse fondée sur nos recherches, il convient d'abord de rappeler les conclusions auxquelles ont abouti nos prédécesseurs. Celles-ci doivent être scindées en trois groupes :

a. *Le développement foliaire est essentiellement sous la dépendance de facteurs présents dans la feuille elle-même :* à partir du moment où l'initiation de la feuille a eu lieu à l'apex, sa croissance est autonome sans qu'il y ait intervention de quelque autre organe de la plante.

Ce résultat est obtenu par SUSSEX et STEEVES [184, 187, 188] au terme

de leurs observations sur les Fougères *Leptopteris hymenophylloides* et *Osmunda Cinnamomea*.

Ces auteurs montrent, en effet, que le degré de différenciation et de développement des feuilles *excisées* à l'état d'ébauches est le même que si elles étaient demeurées sur le rhizome intact. La forme et la taille de l'organe ne dépendent que de la durée de la phase méristématique, c'est-à-dire de la phase qui précède celle marquée par la croissance de maturation. Si la première est écourtée, les feuilles trop précocement différenciées demeurent juvéniles ; dans le cas contraire, leur maturation n'a lieu que lorsqu'elles ont atteint leur forme adulte. Ces conclusions conduisent leurs auteurs à se demander si la durée des deux phases ne pourrait être modifiée par des facteurs externes, par exemple la nutrition.

On remarquera cependant que les feuilles obtenues dans ces conditions sont loin d'atteindre la taille normale de celles observées sur la plante entière.

b. Les facteurs qui règlent le développement d'un primordium foliaire proviennent des feuilles plus âgées [19, 62, 89, 178, 185, 231].

Les feuilles en voie d'expansion inhibent le développement des feuilles immatures. Cette action inhibitrice peut être remplacée expérimentalement par l'acide indol- β -acétique [89]. Aussi est-il normal de penser que l'auxine formée dans les jeunes feuilles retarde la maturation des primordiums initiés dans le bourgeon terminal.

L'hypothèse formulée par CROTTY [62], très voisine de la précédente, est plus complexe. Étudiant le développement des feuilles successivement formées dans le bourgeon d'*Acrostichum danæfolium*, il suggère la possibilité d'une intervention de processus hormonaux et métaboliques : une augmentation de la teneur en facteurs auxiniques et en substances nutritives des zones de croissance tendrait à freiner la différenciation des primordiums foliaires proches de ces régions.

c. C'est l'apex principal de la tige qui détermine et régularise l'organogénèse et la morphogénèse foliaire (ALLSOPP, WARDLAW, CUTTER [9, 63, 64, 72, 210, 211, 212, 220]).

Selon ces auteurs, l'hétérophylle d'un végétal est la conséquence des changements survenus à son apex. L'état trophique dans lequel il se trouve est alors le facteur déterminant du développement ultérieur des feuilles qu'il initie. Ces résultats conduisent leurs auteurs à expliquer le retour à des formes foliaires juvéniles par une réduction de taille et d'activité du bourgeon terminal. WARDLAW [220] précise en outre que les feuilles sous-développées, observées chez de nombreuses Ptéridophytes, résultent de la réduction de la zone subapicale du rhizome, zone où a lieu la majeure partie du développement des primordiums.

Nos recherches apportent une confirmation expérimentale à ces suggestions. Nous avons en effet constaté, comme le supposent WARDLAW et

ses élèves, qu'un apex de petite taille comporte une zone subapicale très réduite par suite de la maturation très précoce de ses cellules : les feuilles qu'il initie ne présentent pas leurs caractères « adultes » normaux (feuilles épanouies) ; dans les cas extrêmes, elles sont juvéniles. Son activité métabolique est modifiée par suite de lésions cellulaires (nécrose acropète) : la translocation des éléments nutritifs est déviée de son cours normal, ce qui entraîne une diminution des synthèses (protéines, acide désoxyribonucléique). Le taux d'auxine y est faible.

Le degré de développement des feuilles se trouve donc bien sous la dépendance de l'activité méristématique de l'*apex considéré comme un tout* ; qu'à la suite de traitements appropriés, il subisse une atténuation de cette activité, les organes qu'il forme réagissent par une limitation de leur croissance. Ainsi, lorsqu'un explantat est soumis à certaines conditions nutritives défavorables, son développement n'est pas immédiatement aberrant : les premières feuilles formées sont en effet quadrilobes palmées : les zones méristématiques ne sont pas encore lésées. Puis apparaissent des feuilles atypiques qui traduisent déjà un fonctionnement anormal du méristème caulinaire et, par voie de conséquence, des méristèmes foliaires. Enfin, apparaissent des ébauches incapables de se développer en feuilles proprement dites, même du type juvénile : la nécrose acropète envahit tous les tissus, les cellules s'autolysent. La plante ne peut plus proliférer et meurt. Dans le cas des carences, cet ensemble de processus correspond à l'épuisement de la plante en l'élément manquant et dans le cas d'excès, à une intoxication des tissus, ayant tous deux pour conséquence l'arrêt prématuré du développement et de la différenciation des feuilles.

Que les phénomènes qui viennent d'être décrits soient aussi provoqués par d'autres causes que la nutrition minérale indique que ces causes n'agissent pas directement sur la forme des feuilles successivement formées, mais par l'intermédiaire de réactions biologiques plus ou moins complexes.

4° Jusqu'à présent, *seules ont été envisagées les modifications morphologiques présentées par les feuilles*. Mais nous avons vu que, lorsque les conditions nutritives sont défectueuses, les racines du sporophyte sont également touchées. Les deux types d'organes réagissent toujours dans le même sens : *au sous-développement foliaire correspond le sous-développement des racines*. Y a-t-il simple concomitance ou relation causale entre ces deux types de malformation ?

ALLSOPP [6] semble incliner pour la deuxième hypothèse puisqu'il attribue la simplification morphologique des feuilles du *Marsilea* produite par l'action du 2-4 D à la formation de racines surnuméraires : celles-ci détournant à leur profit les métabolites synthétisés dans la plante, le développement des feuilles s'arrête à un stade juvénile. Cette interprétation ne peut être retenue dans notre cas : les études numériques effectuées au cours de ce travail ont montré en effet que les sporophytes à feuilles anormales ne comportent pas un plus grand nombre de racines

et que, très généralement, à une diminution du nombre des racines correspond une diminution équivalente du nombre des feuilles.

Plus intéressants à cet égard sont les résultats obtenus par MARTOS [134, 135] sur des jeunes plantules de Blé : sur des bases très précises (dosage des composés azotés et phosphorés présents dans les organes aériens du végétal privé ou non de ses racines), il établit un lien très net entre le système racinaire et le système foliaire : les racines, par les amino-acides et les composés nucléiques qu'elles fournissent (« fonctions spécifiques »), favorisent le métabolisme protéinique et, par voie de conséquence, la croissance des feuilles.

La supposition de RICHARDSON [159] est très différente. Cet auteur, dont les recherches ont porté sur des germinations d'*Acer Saccharinum*, est amené à conclure que le développement des racines est contrôlé par deux facteurs : l'un, provenant du méristème terminal (l'AIA ?), est responsable de leur initiation ; l'autre, formé dans les feuilles (de nature vitaminique ?), agirait sur leur élongation. L'intervention d'un facteur rhizogène spécifique synthétisé dans les feuilles (rhizocaline de Went et Bouillenne) pourrait également être invoquée ici.

Nous nous bornerons à présenter ces hypothèses. Nos recherches sur ce point sont trop sommaires pour nous permettre d'opter pour l'une d'entre elles.

B. — CONSIDÉRATIONS SUR LES BESOINS NUTRITIFS DU « MARSILEA ».

Comme nous l'avons signalé au début de ce travail, si la morphologie du sporophyte des Fougères a fait l'objet jusqu'alors de recherches nombreuses et intéressantes, peu d'auteurs se sont préoccupés de sa nutrition.

Comme c'est généralement le cas pour les recherches de ce genre, les nôtres ont abouti à la proposition d'un milieu type permettant le développement beaucoup plus important du sporophyte de *Marsilea*. Sur lui, par rapport au milieu de Knop dilué de son volume d'eau, utilisé comme milieu témoin, l'accroissement pondéral des plants est presque doublé. Si l'on en compare la composition avec celle des milieux proposés par nos prédécesseurs (tableaux I et I bis), une constatation globale s'impose aussitôt : sa pauvreté en macro-éléments, à l'exception toutefois du phosphore, dont la teneur est élevée.

C'est là un point qui retiendra un moment l'attention. En effet, il indique que les faibles besoins nutritifs qui caractérisent le prothalle des Fougères, les Mousses ou les Hépatiques [107, 204] se retrouvent chez le sporophyte. On aurait pu penser que, plus complexe par son organisation, ce dernier aurait exigé un appoint nutritif plus élevé que les premiers. On voit ainsi que le *Marsilea* et, peut-être, l'ensemble des Fougères se distinguent, par leurs exigences nutritives, des plantes supérieures [83]. Les principaux processus biologiques (organogenèse, morphogenèse, métabolisme...), bien que s'effectuant de façon comparable, ont donc

besoin, pour se dérouler, d'un apport moindre en éléments nutritifs minéraux. C'est là, du reste, une différence d'ordre quantitatif et non qualitatif. Nous avons en effet montré que les éléments requis sont les mêmes, mais que leurs concentrations sont plus faibles.

La mise en évidence de ce dernier point est, semble-t-il, une justification de notre travail en ce qu'il montre que les milieux de culture mis au point pour des Angiospermes, et habituellement utilisés dans les laboratoires, ne sont pas toujours adaptés aux Végétaux moins évolués. Si chaque groupe végétal a ses exigences propres, il faut aussi se demander s'il n'en est pas de même pour les diverses espèces d'un même groupe. Autrement dit, les conclusions propres au *Marsilea* sont-elles valables pour d'autres sporophytes de Fougère ? On ne peut encore répondre avec certitude, et la bibliographie ne nous renseigne guère à ce sujet. Les observations de SCHWABE [163, 164] (besoins et effets de P et K), d'EDWARDS et ALLSOPP [72] (nutrition azotée), d'ALLSOPP [7] et de BLOOM [34] (milieux minéraux plus ou moins dilués), et de CONWAY et STEPHENS [60] (macro-éléments divers) sont trop générales ou trop fragmentaires pour être utilement retenues. Les recherches de VOTH et BLOOM [35, 205] sont intéressantes à cet égard, car elles portent sur le sporophyte de *Regnellidium diphyllum*, Marsiléacée également. Malheureusement, elles ont été faites dans des conditions non aseptiques et n'ont envisagé qu'un petit nombre de combinaisons minérales calculées suivant la méthode triangulaire. Le milieu optimal proposé par ces auteurs diffère considérablement du nôtre : il est caractérisé par sa richesse en calcium, en nitrates et en sulfates, et sa pauvreté en phosphates. Sur ce milieu, nos cultures dépériraient rapidement. Une des conclusions de VOTH et BLOOM confirme cependant la nôtre : la forte toxicité du magnésium dans un milieu dépourvu de calcium. Toutefois, aucune ramification du rhizome de *Regnellidium* n'est signalée. Peut-être la durée de l'expérience (vingt et un jours) est-elle trop faible pour permettre l'observation de telles anomalies structurales. Il est possible aussi que les réactions de ces deux espèces, bien que voisines systématiquement, ne soient pas les mêmes vis-à-vis des conditions nutritives défavorables. Là encore, des recherches critiques seraient souhaitables.

C. — CONSIDÉRATIONS SUR LA STRUCTURE ANATOMIQUE DU RHIZOME

Quelques remarques maintenant sur les changements anatomiques présentés par les rhizomes des sporophytes soumis à des conditions nutritives défectueuses. Ces changements sont soit discrets (modification de taille, par exemple, c'est-à-dire variations seulement dimensionnelles), soit profonds (modifications de tous les caractères : taille, forme, nombre des éléments du rhizome, c'est-à-dire variations quantitatives et qualitatives).

Comme la plupart des auteurs qui ont observé de telles modifications

[65, 66, 111, 128, 129, 130, 196, 203], nous pouvons difficilement leur donner une interprétation physiologique. Quelques rapprochements peuvent toutefois être tentés dans cette voie.

Premier point notable : les modifications affectant l'aérenchyme. Normalement, ce tissu est assez développé dans le sporophyte de *M. d.* pour en assurer la flottabilité. Dans le cas de croissance anormale, il est réduit : la plante tombe au fond du tube de culture. Il est alors possible que ses malformations morphologiques et anatomiques ne fassent alors que s'accroître. Les conclusions de GLUCK [84] nous portent à les attribuer à une aération fortement diminuée et à un changement de la pression de l'eau intratissulaire.

Plus intéressante est l'hypertrophie de l'endoderme, généralement observée à la suite de déséquilibres trophiques. A quoi est-elle due ? Nous avons noté un parallélisme étroit entre la taille des éléments endodermiques et la teneur en amidon et en tanins des cellules avoisinantes. Or, celle-ci est, elle-même, inversement proportionnelle à l'hydratation des tissus. Dans les conditions nutritives défectueuses, le sporophyte de *M. d.* se déshydrate. On peut donc penser que le déséquilibre nutritif, entraînant la déshydratation des tissus en même temps que les déviations métaboliques, conduit à l'hypertrophie endodermique. Seules des recherches particulières pourraient renseigner sur la validité d'une telle relation. Quoi qu'il en soit, elles devraient sans doute être orientées vers l'étude du métabolisme de l'eau dans la plante. C'est cette voie qu'ouvrent, en effet, les résultats obtenus par EAMES et MAC DANIELS, SMITH et VAN FLEET [70, 173, 201], pour qui l'endoderme apparaît être « a watertight layer », c'est-à-dire une barrière régularisant les échanges de l'eau entre la stèle et le cortex.

Autre observation qui retiendra l'attention : *la réduction ou la disparition complète de la moelle dans le rhizome qui porte des feuilles juvéniles :* elle a souvent été rapportée [6, 40, 91, 209, 210, 211, 212, 213], notamment par BOWER [40], dont les expériences de mises en inanition sont convaincantes. Cet auteur a en effet noté une corrélation étroite entre l'importance de la trace foliaire et la complexité de la stèle. « La protostèle est liée à une trace foliaire réduite n'influençant pas la stèle ; une trace foliaire importante détermine la transformation de la protostèle en une solénostèle. » Il montre aussi que, lorsque les dimensions de la tige — ou du rhizome — s'accroissent, par suite d'une nutrition convenable par exemple, il n'y a pas seulement, dans ces organes, agrandissement ou augmentation du nombre de leurs cellules, mais aussi extension de la complexité stélisque. Inversement, sous l'effet d'une nutrition insuffisante, on observe une réduction de la taille de la stèle en même temps que sa simplification histologique. Pour BOWER, ces variations de complexité seraient elles-mêmes en étroite relation avec la taille relative du méristème

apical. Ainsi, suivant cet auteur, le facteur dimensionnel (*size factor*) conditionne la morphologie et l'anatomie de la plante : c'est donc un *morphoplastic factor*. WARDLAW [210], par ses recherches, a vérifié ce point de vue. Nos observations le confirment aussi : le *Marsilea* carencé en calcium, qui possède un apex de petite taille, ne porte que des feuilles tôt arrêtées dans leur développement (feuilles rudimentaires, juvéniles) : le rhizome montre alors une stèle de structure simplifiée dans laquelle la moelle n'est représentée que par quelques cellules ou, dans les cas extrêmes, a complètement disparu : c'est le retour progressif à la proto-stèle.

Ainsi, pour comprendre les modifications de structure provoquées par des conditions nutritives anormales, il est nécessaire de considérer non pas tel ou tel organe isolément des autres, mais leur ensemble, la forme de ceux-ci étant en définitive sous l'étroite dépendance du fonctionnement du méristème apical.

Une anomalie curieuse de la différenciation et de la lignification des trachéides lorsque les conditions nutritives sont défavorables a été mise en évidence. Les observations ont montré que ces deux phénomènes sont distincts l'un de l'autre. La différenciation des trachéides peut être tardive (cas des sporophytes témoins) et la lignification appréciable ; inversement, dans les cultures anormales, si la formation des trachéides est plus précoce, la lignification peut être faible (déficience en calcium) ou nulle (excès de calcium).

1° A maintes occasions, nous avons noté que la *différenciation* des éléments xylémiens est plus lente chez les témoins que chez les cultures carencées. Selon LANG [118], la différenciation vasculaire serait régie par trois types de facteurs :

- des « stimuli fonctionnels » ;
- des « facteurs inductifs » originaires des régions les plus âgées ;
- des « stimuli formateurs » de nature inconnue provenant de l'apex.

Pour WARDLAW [210, 211, 212, 213], les deux premiers facteurs sont négligeables, et seul importe le troisième : c'est de l'apex, en effet, que diffusent les substances responsables de la formation des trachéides. Ces considérations sont malheureusement hypothétiques, la nature de ces facteurs n'étant jamais définie. Les recherches récentes sur ce sujet aboutissent souvent à des résultats contradictoires.

Ainsi, pour JACOBS, WETMORE et SOROKIN, WETMORE et CAMUS [51, 108, 224, 225], il existe une étroite relation entre l'AIA et la différenciation des vaisseaux. Mais, comme le remarquent SOLBERG et HIGENBOTHAM [180], il est difficile de concilier le rôle habituellement attribué à l'auxine (celui de facteurs stimulant l'activité méristématique, c'est-à-dire retardant la différenciation et l'agrandissement cellulaire) avec celui qu'on lui prête dans les processus de différenciation vasculaire. Il semble, en effet, para-

doxal que l'AIA puisse à la fois intervenir dans ce dernier phénomène, tout en participant à l'extension des cellules et à l'accroissement de leur plasticité [47], c'est-à-dire à des processus contraires à leur épaissement. Cette contradiction conduit alors SOLBERG et HIGINBOTHAM à envisager d'autres modes d'action qui, dans leurs lignes générales, confirment les hypothèses de LANG. Ces auteurs montrent, en effet, sur des segments de tiges de pois que, si l'AIA d'origine apicale est bien un facteur d'élongation cellulaire, d'autres facteurs d'origine basale, c'est-à-dire provenant des régions plus âgées de la plante, sont responsables de la différenciation vasculaire : saccharose, eugénol, etc., comme le prouvent les effets qu'ils produisent lorsqu'ils sont ajoutés aux milieux de culture. Par l'hormone qu'il produit (AIA entre autres substances), l'apex ne contribue donc qu'à retarder les transformations histochimiques qui aboutissent à la formation des trachéides. C'est d'ailleurs à une conclusion semblable qu'aboutit SIEGEL [169 à 172], à la suite de recherches sur la biochimie de la lignification.

Qu'apportent dans ce domaine les résultats obtenus sur *Marsilea* ? Chez les témoins, plantes riches en « auxines », capables de s'allonger considérablement, la différenciation des trachéides a lieu à une distance assez éloignée de l'apex. Au contraire, chez les cultures ramifiées, pauvres en facteurs hormonaux, faiblement allongées et pourvues d'abondantes réserves, cette différenciation est précoce.

Il faut alors penser que les facteurs qui interviennent dans ce phénomène viennent d'ailleurs que l'apex, c'est-à-dire des régions plus différenciées. Les recherches des biochimistes s'étant penchés sur ce difficile problème ont montré [78, 79, 96, 115, 148, 149, 169 à 172] qu'il s'agit de sucres, de polyphénols, de coniférine...

Nos recherches abondent donc dans le sens du point de vue de LANG.

2° Quelques remarques maintenant s'imposent sur le processus de la *lignification* des trachéides.

D'après SIEGEL [169 à 172], la biosynthèse des lignines s'effectuerait suivant une suite de réactions impliquant la transformation progressive en lignines de composés précurseurs en ($C_6 - C_3$) avec l'intervention du peroxyde H_2O_2 et de peroxydase. La formation de H_2O_2 est elle-même liée à l'activité auxinique des tissus [15]. Or, nous avons vu à diverses reprises que des désordres nutritifs peuvent altérer le métabolisme des glucides et des composés phénoliques, c'est-à-dire des précurseurs de la lignine. Il en est de même pour l'AIA.

Par ailleurs, des examens histochimiques (non mentionnés dans la partie expérimentale de ce travail, parce que trop succincts), effectués selon la méthode de JENSEN [110], nous ont montré que la peroxydase est abondante dans les tissus des cultures témoins, alors qu'elle est généralement absente de ceux des cultures aberrantes obtenues par déséquilibre de la nutrition calcique (déficience ou excès). Il semble donc bien y avoir dans les sporophytes de *M. d.* un lien étroit entre la teneur des tissus en

auxine (AIA), leur richesse en peroxydase et le degré de lignification des trachéides.

D. — CONSIDÉRATIONS SUR LA RAMIFICATION DES SPOROPHYTES.

Nous avons vu qu'en cas de carence ou d'insuffisance en calcium les sporophytes se ramifient par suite du développement de leurs bourgeons extra-axillaires : le caractère humoral et trophique d'une telle anomalie a été mis en évidence. Les théories permettant d'expliquer les mécanismes qui contrôlent l'activité des bourgeons sous-apicaux sont nombreuses. Il n'est pas de notre propos de les exposer en détail ici. On trouvera quelques mises au point récentes dans [51, 83, 192, 193].

D'une manière générale, pour expliquer la latence des bourgeons placés sous l'apex, les premières théories attribuaient un rôle primordial à l'apex principal de la tige. Pour GEBEL [86], ce serait essentiellement un « centre d'attraction » de substances nutritives; celles-ci étant monopolisées par lui, il n'en resterait plus assez pour permettre la croissance des bourgeons latéraux. WENT [221, 222], puis SKOOG [165, 167] reprennent cette théorie dans ses grandes lignes en y ajoutant l'intervention corrélatrice de l'auxine produite à l'apex. Pour d'autres auteurs, seule doit être considérée la diffusion basipète de l'auxine, d'origine apicale. A celle-ci est attribué, un effet soit direct [190, 191], soit indirect [120, 176]. Elle régirait la formation d'un inhibiteur non polarisé [94, 95, 112, 124].

Aucune de ces théories n'est généralisable : aussi pense-t-on aujourd'hui que la latence des bourgeons sous-apicaux dépend à la fois de l'auxine, de régulateurs de croissance (dételés par chromatographie : activateur ou inhibiteurs divers) et de facteurs trophiques. Les modifications de l'équilibre et des interactions entre ces facteurs aboutiraient au déclenchement de stimulations ou de blocages [83, 166, 192, 193]. En outre, le rôle de l'apex n'apparaît plus aussi exclusif puisque les feuilles et les racines interviennent dans l'inhibition corrélatrice des bourgeons [3, 54, 55, 57, 58, 61, 67, 158, 179].

Les recherches effectuées sur le sporophyte de *M. d.* confirment la théorie actuelle de l'inhibition : la ramification du rhizome de *Marsilea* est due, en effet, à des causes à la fois humorales et métaboliques.

— Les cultures ramifiées sont pauvres en AIA et en activateur A (supposé hormonal, puisque son identification n'a pas été réalisée). Le rôle certain de l'AIA a été démontré : ajouté expérimentalement aux milieux sur lesquels s'observe la ramification, l'auxine synthétique freine le buissonnement de façon nette.

— Les racines et les feuilles sous-développées et nécrosées ne renforcent plus l'inhibition corrélatrice des bourgeons. Lorsque ces organes sont normaux, leur contribution à cette inhibition est indubitable. Il suffit de les exciser (expériences sur plants témoins) pour s'en convaincre.

— Les métabolites formés sont anormaux et leur migration atténuée

ou bloquée. La protéogenèse, elle aussi amoindrie, ne fournit plus les précurseurs nécessaires à la formation des auxines.

Le problème apparaît donc extrêmement complexe. Il convient de souligner que les facteurs morphogènes sont multiples et ne peuvent être ramenés au seul AIA. L'analyse chromatographique constitue, à cet égard, une voie expérimentale fructueuse. De cette manière, une substance promotrice de croissance, l'activateur A, a été décelée. Il est logique de penser, étant donné son Rf, qu'il est l'équivalent de l'activateur mis en évidence par BEAUCHAMP [23] et de l'*accelerator* α de BENNET-CLARK et KEFFORD, reconnu à l'heure actuelle dans de nombreux Végétaux, quoique non identifié chimiquement [20, 21, 24, 25, 30, 106, 112, 113, 156].

BENTLEY et ses coéquipiers ont montré qu'il ne pouvait s'agir de l'acide indol-pyruvique [29], comme l'avaient pensé STOWE et THIMANN [186]. BENNET-CLARK et WHEELER [26] ont précisé, par ailleurs, qu'il n'était pas l'acide indolyl-acétilaspartique. Qu'il soit un artefact produit pendant la préparation de l'extrait acide des tissus, comme on l'a supposé [44], n'est pas universellement reconnu [21]. Il est incontestable que, pour le *Marsilea*, c'est un facteur important dans le contrôle de la ramification.

Des inhibiteurs spécifiques responsables de la latence des bourgeons axillaires ont également été reconnus [4, 106, 124, 125]. KEFFORD [112] et HEMBERG [94, 95] ont cherché à attribuer le blocage de ces bourgeons à l'intervention de « l'inhibiteur β » présent dans leurs extraits. Cependant, si un tel mécanisme est valable, il n'est pas commun à tous les Végétaux. BURTON [48], BUCH et SMITH [45], en effet, n'ont pu établir de relation entre latence des « yeux » de Pomme de terre et inhibiteur spécifique ; pourtant un tel inhibiteur est décelable dans leurs extraits. C'est à une conclusion similaire qu'aboutit KEFFORD, étudiant les régulateurs de croissance présents dans les pieds normaux ou ramifiés (*frenched*) de Tabac [114]. Le problème se complique en outre par le fait que, de tous les inhibiteurs signalés jusqu'à ce jour, beaucoup doivent être considérés comme des corps de nature non hormonale, ou comme des produits toxiques dont le rôle physiologique n'est pas déterminé (inhibiteur Ω de FERENCZY, inhibiteur de BURTON, de TORREY, de PHILLIPS et WAREING [45, 48, 75, 153, 197, 711].

Chez le *Marsilea*, le blocage des bourgeons n'a pu être lié à la détection d'un tel inhibiteur qui aurait été caractéristique des extraits témoins. Le fait qu'il fasse défaut à cette espèce nous conduit à formuler diverses suppositions. On peut penser tout d'abord qu'il est détruit par la technique même de la préparation des extraits acides, ou bien qu'il demeure masqué par les facteurs auxiniques provenant d'autres organes de la plante. Quelques essais (non rapportés dans ce travail) invitent à penser que cette hypothèse est vraisemblable. En effet, l'étude séparée d'extraits de tissus apicaux et d'extraits du reste de la culture a montré que l'activateur A, par exemple, n'est présent que dans les tissus différenciés, alors que les tissus méristématiques de la pointe de l'axe principal en sont dépourvus. (Doit-on alors le considérer comme un précurseur de l'AIA ?). De même

L'apex contient un promoteur de croissance de caractère peu acide, promoteur qu'on ne retrouve pas dans les autres tissus. Ces observations sont trop succinctes pour qu'on puisse en tirer une conclusion solide. Elles nous ont paru toutefois mériter l'attention, car elles suggèrent la grande complexité des mécanismes humoraux qui se trouvent à l'origine des phénomènes de ramification. Pour les préciser, il serait sans doute nécessaire d'étudier le contenu hormonal, non de tous les tissus globalement, mais des différents organes isolément. Ainsi pourrait-on espérer mettre en évidence, à partir d'extraits de bourgeons latents isolés du reste de la plante, un inhibiteur qui leur serait spécifique.

Les limites mêmes de ce travail ne nous ont pas permis d'en faire une étude complète.

Un dernier point notable concernant le rôle des facteurs hormonaux du *Marsilea*. A maintes reprises, nous avons constaté une étroite relation entre richesse des noyaux en acide désoxyribonucléique (ADN) et pouvoir de prolifération des bourgeons principaux chez les témoins, latéraux chez les cultures ramifiées. Ce pouvoir ne se trouve-t-il pas lui-même en étroite relation avec le taux de ces tissus en auxine ?

Un tel rapprochement a été rapporté par divers auteurs [32, 97, 98, 137, 138, 167]. SKOOG [167] voit dans l'auxine un agent de la chromatisation et de la contraction des noyaux des bourgeons latéraux libérés de l'inhibition apicale et de leur aptitude à entrer en mitoses. Dans une même perspective, HOCQUETTE [97] conclut que « les auxines confèrent aux noyaux quiescents l'apparence interphasique, et même celle qui annoncerait une prophase... Elles apparaissent ainsi comme des agents de chromatisation des acides désoxyribonucléiques ». Cette action est naturellement indirecte : c'est parce qu'elles stimulent la synthèse des nucléotides entrant dans la composition des acides nucléiques et les réactions de phosphorylation que les auxines favorisent la synthèse de l'ADN (BISWAS et SEN [32]).

Les observations faites sur le sporophyte de *M. d.* vérifient ces conclusions. Dans le cas de la ramification, le bourgeon terminal pauvre en ADN a une activité réduite ou nulle. Celle-ci, au contraire, caractérise les bourgeons latéraux riches en ADN. Il est probable alors, d'après ce qui précède, que le premier doit être dépourvu d'ALA. L'origine de la faible quantité de cette substance décelée chromatographiquement dans les extraits de toute la plante doit donc vraisemblablement provenir, non pas de l'apex principal, mais des bourgeons latéraux. Seuls des examens physiologiques et analytiques des divers organes de la plante pris isolément pourraient permettre de vérifier une telle supposition. Cette directive a déjà été mentionnée plus haut.

Quoi qu'il en soit, nos recherches, si elles suggèrent un lien entre le métabolisme des acides nucléiques et celui des auxines, montrent que ces processus dépendent eux-mêmes des conditions de culture externes, en particulier de l'apport en éléments minéraux, notamment en calcium.

Ainsi, au cours des recherches entreprises pour élucider le mécanisme

de la ramification et avec l'appui des données bibliographiques, des liaisons étroites ont été constatées, suggérées ou déduites entre les facteurs biologiques qui règlent la structure d'ensemble du sporophyte. Ces facteurs sont tous interdépendants et sont eux-mêmes tributaires des facteurs externes comme la composition saline du milieu de culture. Tant que celle-ci est favorable, les interactions entre ces facteurs aboutissent à la croissance normale de la plante. Mais que ces conditions nutritives viennent à être perturbées, les troubles de développement du végétal apparaissent aussitôt par suite de déséquilibres variés : métaboliques, humoraux. Dans ce domaine, le bourgeon terminal joue un rôle fondamental dans l'édification de la plante. Il est étroitement lié à divers processus biologiques. Il contribue à les induire et à les stimuler, mais, à son tour, il peut être influencé par eux. L'ensemble de ces actions réciproques est lui-même sous la dépendance des éléments nutritifs minéraux fournis à la plante. Il s'agit donc là d'un faisceau très complexe de processus qui se complètent. Pour les expliquer, il ne faut pas faire de distinctions entre Morphologie, Physiologie et Biochimie (NEEDHAM [139]).

* * *

Au terme de ce travail, il convient maintenant d'en dégager sommairement les idées essentielles.

Nous avons vu que le développement du sporophyte de *Marsilea*, comme celui de tout autre végétal, résulte de multiples processus ontogéniques, liés les uns aux autres de manière intime. Nous nous sommes efforcée de les mettre en évidence et d'en analyser les modalités.

Par des changements systématiques des conditions nutritives, nous avons été amenée à décrire et à analyser les particularités morphologiques, anatomiques et physiologiques du sporophyte. Le rôle de certains éléments, et tout particulièrement du calcium, a été, de cette manière, mis en évidence. Mais les observations accumulées ont nécessité, pour être comprises, des recherches connexes : pour interpréter les phénomènes de ramification, nous avons eu recours à des méthodes analytiques, physiologiques et histologiques. L'ensemble de ces investigations nous a conduite à formuler des conclusions générales que nous nous sommes efforcée d'expliquer en tenant compte des connaissances actuelles.

A côté des résultats positifs que notre travail a pu apporter, il faut noter les problèmes qu'il a soulevés.

Le premier à mentionner, semble-t-il, est le problème posé par la présence des feuilles sous-développées sur les plants anormaux : le déterminisme de leur formation reste imprécis.

D'autre part, l'examen approfondi des méristèmes apicaux (principaux ou latéraux) est souhaitable, car c'est de lui que l'on peut espérer avoir une explication des processus de développement aberrant du sporophyte. Ce travail devrait s'accompagner d'analyses biochimiques orientées dans divers sens (facteurs humoraux, métabolites).

Une autre voie s'offre aussi à nous : nous avons vu que, sous l'effet de certains déséquilibres nutritifs (apport en calcium notamment), les sporophytes se ramifient. Mais comment expliquer que le même phénomène ne soit pas provoqué par d'autres déséquilibres dont les effets sur la plante sont, par ailleurs, semblables aux précédents (nécroses, sous-développement des organes)? Et comment comprendre que de telles modifications puissent être provoquées par des auxines (indol-acétonitrile [183]) employées à des doses non physiologiques?

Les limites mêmes de ce travail ne nous ont pas permis d'aborder ces questions autrement que de façon préliminaire. Les problèmes soulevés constituent, à cet égard, le meilleur stimulant pour continuer dans les voies difficiles, mais combien attachantes, de la recherche.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. ÅBERG (B.). — 1950. On auxin antagonists and synergists in root growth (*Physiol. Plant.*, **3**, 447).
2. ÅBERG (B.). — 1953. On the interaction of 2-3-5 triiodobenzoic acid and maleic hydrazide with auxin (*Physiol. Plant.*, **6**, 277).
3. ALLARY (S.). — 1958. Remarques sur l'inhibition des bourgeons axillaires de la pousse herbacée des végétaux ligneux (*C. R. Acad. Sci.*, **246**, 1071).
4. ALLARY (S.). — 1959. Substances de croissance et dormance des bourgeons de *Quercus pedunculata* Ehrh. (*C. R. Acad. Sci.*, **249**, 1557).
5. ALLSOPP (A.). — 1952. Longevity of *Marsilea* sporocarps (*Nature*, **169**, 79).
6. ALLSOPP (A.). — 1952. Experimental and analytical studies of Pteridophytes : XVII : The effects of various physiologically active substances on the development of *Marsilea* in sterile culture (*Ann. Bot. N. S.*, **16**, 165).
7. ALLSOPP (A.). — 1953. XIX : Investigations on *Marsilea* : 2. Induced reversion to juvenile stages (*Ann. Bot. N. S.*, **17**, 37).
8. ALLSOPP (A.). — 1953. XXI : Investigations on *Marsilea* : 3. The effect of various sugars on development and morphology (*Ann. Bot. N. S.*, **17**, 447).
9. ALLSOPP (A.). — 1954. Juvenile stages of plants and the nutritional status of the shoot apex (*Nature*, **173**, 1032).
10. ALLSOPP (A.). — 1954. A comparison of the effects of 3-indolylacetic acid and 3-indolylacetonitrile on the development of sporelings of *Marsilea* in aseptie culture (*J. exp. Bot.*, **5**, 16).
11. ALLSOPP (A.). — 1954. XXIV : Investigations on *Marsilea* : 4. Anatomical effects of changes in sugar concentration (*Ann. Bot. N. S.*, **18**, 449).
12. ALLSOPP (A.). — 1955. XXVII : Investigations on *Marsilea* : 5. Cultural conditions and morphogenesis, with special reference to the origin of land and water forms (*Ann. Bot. N. S.*, **19**, 247).
13. ALLSOPP (A.). — 1956. Morphogenetic effects of 3-indolylacetonitrile on sporelings of *Marsilea* in aseptie culture (*J. exp. Bot.*, **7**, 1).
14. ALLSOPP (A.). — 1956. Apical dominance in *Marsilea*, with particular reference to the effects of 3-indolylacetic acid, 3-indolylacetonitrile and coumarin on lateral bud development (*J. exp. Bot.*, **7**, 14).
15. ANDREAE (W. A.) et ANDREAE (S. R.). — 1953. Studies on indoleacetic acid metabolism. I. The effects of methyl umbelliferone, maleic hydrazide, and 2-4 D on indoleacetic oxydase (*Can. J. Bot.*, **31**, 426).
16. ANGST (E. C.). — 1925-1928. Observations on *Pteris aquilina* (*Publ. Puget. sound Biol. Stat.*, **5**, 261).
17. ANSIAUX (J. R.). — 1956. Symptômes provoqués chez la tomate par une double carence cationique. Bull. Cl. Sci. (*Acad. Roy. Belg.*, 5^e sér., **42**, 664).
18. ASHBY (E.). — 1948. Studies in the morphogenesis of leaves : I. An essay on leaf shape (*New. Phytol.*, **47**, 153).
19. ASHBY (E.). — 1948. *Ibid.* : II. The area, cell size and cell number of leaves of *Ipomoea* in relation to their position on the shoot (*New. Phytol.*, **47**, 177).
20. AUDUS (L. J.) et THRESH (R.). — 1956. The effects of synthetic growth-regulator treatments on the levels of free endogenous growth-substances in plants (*Ann. Bot. N. S.*, **20**, 439).
21. AUDUS (L. J.) et GUNNING (B. E. S.). — 1958. Growth substances in the roots of *Pisum sativum* (*Physiol. Plant.*, **11**, 685).
22. BAMFORD (R.). — 1931. Changes in roots tips of wheat and corn grown in nutrient solutions deficient in calcium (*Bull. Torrey. Bot. Club.*, **58**, 149).

23. BEAUCHAMP (C.). — 1958. La constitution auxinique des tabacs sains ou virosés (*Rev. Gén. Bot.*, **65**, 477).
24. BENNET-CLARK (T. A.) et KEFFORD (N. P.). — 1953. Chromatography of the growth substances in plant extracts (*Nature*, **171**, 645).
25. BENNET-CLARK (T. A.), TAMBIAH (M. S.) et KEFFORD (N. P.). — 1952. Estimation of plant growth substances by partition chromatography (*Nature*, **169**, 452).
26. BENNET-CLARK (T. A.) et WHEELER (A. W.). — 1959. The metabolism of 3-indolylacetic acid in plant tissues (*J. exp. Bot.*, **10**, 468).
27. BENTLEY (J. A.). — 1950. An estimation of a method of auxin assay using the growth of isolated sections of *Avena* coleoptiles in test solutions (*J. exp. Bot.*, **1**, 201).
28. BENTLEY (J. A.) et HOUSLEY (S.). — 1954. Bio-assay of plant growth hormones (*Physiol. Plant.*, **7**, 405).
29. BENTLEY (J. A.), FARRAR (K. R.), HOUSLEY (S.), SMITH (G. F.) et TAYLOR (W. C.). — 1956. Some chemical and physiological properties of 3-indolpyruvic acid (*Biochem. J.*, **64**, 44).
30. BENTLEY (J. A.). — 1958. The naturally-occurring auxins and inhibitors (*Ann. Rev. Plant Physiol.*, **9**, 47).
31. BINET (M. P.). — 1958. La morphogenèse des feuilles : photopériode et développement hétéroblastique chez *Ulex europaeus* L. (*Rev. Gén. Bot.*, **65**, 365).
32. BISWAS (B. B.) et SEN (S. P.). — 1959. Relationship between auxins and nucleic acid in synthesis in coleoptiles tissues (*Nature*, **184**, 1824).
33. BLANC (D.). — 1958. Influence de la nutrition azotée sur les propriétés d'échanges des racines (*C. R. Acad. Sci.*, **246**, 2035).
34. BLOOM (W. W.). — 1955. Growth responses of *Regnellidium diphyllum* sporelings to variations in the concentration of the nutrient solution (*Indiana Acad. Sci.*, **65**, 62).
35. BLOOM (W. W.) et VOTH (P. D.). — 1956. Responses of *Regnellidium diphyllum* to nutrient supply and photoperiod (*Bot. Gaz.*, **117**, 173).
36. BONNET (L. M.). — 1955. Contribution à l'étude des Hydroptéridées. I. Recherches sur *Pilularia globulifera* L. et *P. minuta* Dur. (*La Cellule*, **57**, 131).
37. BONNET (L. M.). — 1956. *Ibid.* ; IV. Commentaires et conclusions générales (*Naturalia Monspeliensia. Ser. Bot.*, **8**, 38).
38. BOODLE (L. A.). — 1901. The structure of the leaves of the bracken (*Pteris aquilina*) in relation to environment (*J. Linn. Soc. Bot.*, **35**, 659).
39. ROSEMARK (N. C.). — 1954. The influence of nitrogen on root development (*Physiol. Plant.*, **7**, 497).
40. BOWER (F. O.). — 1923, 1926, 1928. *The Ferns*. Cambridge.
41. BOWER (F. O.). — 1930. *Size and form in plants*. Londres.
42. BRAY (H. G.) et THORPE (W. V.). — 1954. Analysis of phenolic compounds of interest in metabolism (*Meth. Biochem. Anal.*, **1**, 27).
43. BREITHOF (M.). — 1959. Recherches sur l'influence de quelques substances de croissance sur la ramification de l'arachide (*Agricult. Belg.*, **7**, 207).
44. BRITTON (G.), HOUSLEY (S.) et BENTLEY (J. A.). — 1956. Studies in plant growth hormones. V. Chromatography of hormones in excised and intact roots of tomato seedlings (*J. exp. Bot.*, **7**, 239).
45. BUCH (M. L.) et SMITH (O.). — 1959. The acidic growth inhibitor of potato tubers in relation to their dormancy (*Physiol. Plant.*, **12**, 706).
46. BURSTRÖM (H.). — 1954. Studies on growth and metabolism of roots; IX. The influence of auxin and coumarin derivatives on the cell wall (*Physiol. Plant.*, **7**, 548).
47. BURSTRÖM (H.). — 1957. Auxin and the mechanism of root growth (*Sympos. Soc. expt. Biol.*, n° 11, 44).
48. BURTON (W. G.). — 1956. Some observations on the growth substances in ether extracts of the potato tuber (*Physiol. Plant.*, **9**, 567).
49. BUVAT (R.). — 1955. Sur la structure et le fonctionnement du point végétatif de *Selaginella caulescens* Spring., var. *amæna* (C. R. Acad. Sci., **241**, 1833).
50. BUVAT (R.). — 1955. Fonctionnement de l'apex des tiges dichotomes et bistéliques de *Selaginella Kraussiana* Brown (C. R. Acad. Sci., **241**, 1979).

51. CAMUS (G.). — 1949. Recherches sur le rôle des bourgeons dans les phénomènes de morphogenèse (*Thèse Doct., Paris*).
52. CHAMPAGNAT (R.). — 1952. Les départs de bourgeons axillaires sur la partie moyenne des pousses. Étude d'une plante herbacée, *Cicer arietinum* L. Comparaison avec les « rameaux anticipés » des Végétaux ligneux (*C. R. Acad. Sci.*, **235**, 389).
53. CHAMPAGNAT (R.). — 1952. Les levées d'inhibition de la base des pousses de *Cicer arietinum* L. (*C. R. Acad. Sci.*, **235**, 630).
54. CHAMPAGNAT (P.). — 1954. Recherches sur les « rameaux anticipés » des Végétaux ligneux (*Rev. Cyto. Biol. Vég.*, **15**, 1).
55. CHAMPAGNAT (P.). — 1955. Les corrélations entre feuilles et bourgeons de la pousse herbacée du lilas (*Rev. Gén. Bot.*, **62**, 325).
56. CHAMPAGNAT (P.). — 1955. Corrélations de croissance dans leur rapport avec l'auxine (*Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég.*, **1**, 13).
57. CHAMPAGNAT (P.) et DALZON (M.). — 1958. Inhibitions par carence sur les plantules de Dicotylédones (*Rev. cytol. Biol. vég.*, **19**, 337).
58. CHAMPAGNAT (P.) et AFFRAIX (G.). — 1958. Influence du bourgeon épicytaire mutilé ou affaibli sur les corrélations entre la feuille et son bourgeon axillaire chez les Dicotylédones (*Rev. Gén. Bot.*, **65**, 653).
59. COLEMAN (R. G.) et RICHARDS (F. J.). — 1956. Physiological studies in plant nutrition ; XVIII. Some aspects of nitrogen metabolism in barley and other plants in relation to potassium deficiency (*Ann. Bot. N. S.*, **20**, 393).
60. CONWAY (E.) et STEPHENS (R.). — 1957. Sporeling establishment in *Pteridium aquilinum*: effects of mineral nutrients (*J. ecol.*, **45**, 389).
61. COURDURoux (J.-Cl.). — 1957. Inhibition et stimulation chez le *Scrofularia nodosa* L. (*Bull. Soc. Bot. Fr.*, **104**, 457).
62. CROTTY (W. J.). — 1955. Trends in the pattern of primordial development with age in the fern *Acrostichum danaeefolium* (*Amer. J. Bot.*, **42**, 627).
63. CUTTER (E. C.). — 1955. Experimental and analytical studies of Pteridophytes ; XXIX. The effect of progressive starvation on the growth and organization of the shoot apex of *Dryopteris aristata* Druce (*Ann. Bot. N. S.*, **19**, 485).
64. CUTTER (E. C.). — 1957. *Ibid.* ; XXXVI. Further experiments on the developmental potentialities of leaf primordia in *Dryopteris aristata* Druce (*Ann. Bot. N. S.*, **21**, 343).
65. DAVIS (D. E.). — 1949. Some effects of calcium deficiency on the anatomy of *Pinus taeda* (*Amer. J. Bot.*, **36**, 276).
66. DAY (D.). — 1929. Some effects of calcium deficiency on *Pisum sativum* (*Plant Physiol.*, **4**, 493).
67. DOSTAL (R.). — 1959. Dalsi experimentalné morfologické studie (*Prace brn. Zakl. ceskosl. Akad. Ved.*, **31**, n° 1, 1).
68. DREVON (B.), BERNARD (A.) et MANDON (D.). — 1953. Microdosage du Ca^{++} sanguin utilisant l'acide éthylènediaminetétracétique et la murexide (*C. R. Soc. Biol. Lyon*, **147**, 1420).
69. DREVON (D.). — 1954. Sur la sensibilité et la précision des méthodes ultra-rapides de dosage de la calcémie (*Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, **14**, 174).
70. EAMES (J. A.) et MACDANIELS (L. H.). — 1951. *An introduction to plant anatomy*, Londres, 2^e éd.
71. ECKERSON (S. H.). — 1934. Influence of phosphorus deficiency on metabolism of the tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) (*Contr. Boyce Thompson Inst.*, **3**, 197).
72. EDWARDS (P. St J.) et ALLSOPP (A.). — 1956. The effects of changes in the inorganic nitrogen supply on the growth and development of *Marsilea* in sterile culture (*J. exp. Bot.*, **7**, 194).
73. ESAU (K.). — 1953. *Plant anatomy*, New York, Londres.
74. FERENCZY (L.). — 1957. Examination of ether-extractable growth substances in grape and water melon with paper chromatography (*Phyton*, **9**, 47).
75. FERENCZY (L.). — 1957. Examination of ether-extractable germination inhibitors of fleshy fruits, separated by paper chromatography (*Acta. Biol. Acad. Sci. Hungar*, **8**, 31).

131. MAC MURTREY Jr. (J. E.). — 1932. Relation of calcium and magnesium to the growth and quality of tobacco (*J. Amer. Soc. Agro*, **24**, 797).
132. MAC RAE (D. H.) et BONNER (J.). — 1953. Chemical structure and anti-auxin activity (*Physiol. Plant.*, **6**, 485).
133. MALMSTROM (B. G.) et ROSENBERG (A.). — 1959. Mechanism of metal ion activation of enzymes (*Adv. Enzymol.*, **21**, 131).
134. MARTOS (V.). — 1959. Experimental data concerning effect of plant roots on aerial parts. I. Comparative investigations into the effect of the root system of various plants on the growth of aerial parts and the changes in their fresh and dry weight (*Acta Biol. Acad. Sci. Hungar*, **10**, 1).
135. MARTOS (V.). — 1959. *Ibid.* : II. Nitrogen and phosphate fractions of the basal meristem of young wheat leaves (*Ibid.*, **10**, 15).
136. MESSING (J. H. L.) et OWEN (O.). — 1954. The visual symptoms of some mineral deficiencies on Chrysanthemums (*Plant and Soil.*, **5**, 101).
137. NANDA (K. K.), GROVER (R.) et CHINYOY (J. J.). — 1957. Some observations on lateral bud development in *Panicum miliaceum* and *Setaria italica* (*Phyton*, **8**, 97).
138. NAYLOR (J. M.). — 1958. Control of nuclear processes by auxin in axillary buds of *Tradescantia paludosa* (*Canad. J. Bot.*, **36**, 221).
139. NEEDHAM (J.). — 1942. *Biochemistry and morphogenesis*, Cambridge.
140. NICHOLS (R.). — 1958. A possible source of error in the chemical detection of indolylacetic acid in plants (*Nature*, **181**, 919).
141. NICKELL (L. G.). — 1958. Physiological studies with *Azolla* under aseptic conditions. I. Isolation and preliminary growth studies (*Amer. Fern J.*, **48**, 103).
142. NIEDERGANG-KAMIEN (E.) et SKOOG (F.). — 1956. Studies on polarity and auxin transport in plants. I. Modification of polarity and auxin transport by triiodobenzoic acid (*Physiol. Plant.*, **9**, 60).
143. NIGHTINGALE (G. T.), SCHERMERHORN (L. G.) et ROBBINS (W. R.). — 1930. Some effects of potassium deficiency on the histological structure and nitrogenous and carbohydrates constituents of plants (*New Jersey Agr. Exp. Sta. Bull.*, 499).
144. NITSCH (J. P.). — 1955. Methods for the investigation of natural auxins and growth inhibitors. In *The Chemistry and mode of action of plant growth substances*, Londres, 3.
145. NITSCH (J. P.) et NITSCH (C.). — 1955. Séparation chromatographique des auxines de l'ovule fécondé de haricot à différents stades de son développement (*Soc. Bot. Fr.*, **337**, 528).
146. NITSCH (J. P.) et NITSCH (C.). — 1956. Studies on the growth of coleoptile and first internode sections : a new sensitive straight growth test for auxins (*Plant Physiol.*, **31**, 94).
147. NJOKU (E.). — 1958. Effect of gibberilic acid on leaf form (*Nature*, **182**, 1097).
148. NORD (F. F.) et SCHUBERT (W. J.). — 1957. On the mechanism of lignification (*Tappi*, **40**, 285).
149. NORD (F. F.) et SCHUBERT (W. J.). — 1959. Lignin and the formation of wood (*Experientia*, **15**, 245).
150. PAVILLARD (J.) et BEAUCHAMP (C.). — 1957. Sur la séparation, en chromatographie de partage sur papier, de l'acide indolacétique et de certains composés fluorescents (scopolétine) apparentés à la coumarine (*C. R. Acad. Sci.*, **244**, 678).
151. PAVILLARD (J.) et BEAUCHAMP (C.). — 1957. La constitution auxinique de tabacs sains ou atteints de maladies à virus : présence et rôle de la scopolétine (*C. R. Acad. Sci.*, **244**, 1240).
152. PENSTON (N. L.). — 1931. Studies of the physiological importance of mineral elements in plants. III. A study by microchemical methods of the distribution of potassium in the tomato plant (*Ann. Bot.*, **45**, 673).
153. PHILLIPS (D. J.) et WAREING (P. F.). — 1958. Studies in dormancy of sycamore. I. Seasonal changes in the growth-substance content of the shoot (*J. exp. Bot.*, **9**, 350).

154. PILET (P. E.). — 1953. Étude de l'action de l'hydrazide maléique sur le développement et la teneur en auxines des racines de *Lens culinaris* (*C. R. Acad. Sci.*, **237**, 1430).
155. PILET (P. E.). — 1957. Action of maleic hydrazide on *in vivo* auxin destruction (*Physiol. Plant.*, **10**, 791).
156. PILET (P. E.). — 1958. Analyse biochromatographique des auxines radiculaires (*Rev. Gén. Bot.*, **65**, 605).
157. REDISKE (J. H.) et BIDDULPH (O.). — 1953. The absorption and translocation of iron (*Plant Physiol.*, **28**, 567).
158. REMY (M.) et ALLARY (S.). — 1956. Rôle des feuilles adultes chez le pois (*C. R. Acad. Sci.*, **243**, 1663).
159. RICHARDSON (S. D.). — 1958. The effect of IAA on root development of *Acer saccharinum* L. (*Physiol. Plant.*, **11**, 698).
160. ROBBINS (W. J.). — 1957. Gibberelic acid and the reversal of adult *Hedera* to a juvenile state (*Amer. J. Bot.*, **44**, 743).
161. SCHNEIDER (F.). — 1913. Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Marsiliaceen (*Flora*, **105**, 347).
162. SCHOENE (D. L.) et HOFFMANN (D. L.). — 1949. Maleic hydrazide, an unique growth regulant (*Science*, **109**, 588).
163. SCHWABE (W. W.). — 1951. Physiological studies in plant nutrition. XVI. The mineral nutrition of Bracken. I. Prothallial culture and the effects of phosphorus and potassium supply on leaf production in the sporophyte (*Ann. Bot. N. S.*, **15**, 417).
164. SCHWABE (W. W.). — 1953. *Ibid.* II. The effects of phosphorus and potassium supply on total dry weights, leaf areas, net assimilation rates, starch and water contents... in the sporophyte (*Ann. Bot. N. S.*, **17**, 225).
165. SKOOG (F.). — 1950. Chemical control of growth and organ formation in plant tissues (*Année biol.*, **26**, 545).
166. SKOOG (F.) et TSUI (C.). — 1951. Growth substances and the formation of buds in plant tissues. In *Plant growth substances*, Madison.
167. SKOOG (F.). — 1954. Substances involved in normal growth and differentiation of plants (*Brookhaven Symp. in Biol.*, **6**, 1).
168. SKOOG (F.). — 1955. Growth factors, polarity and morphogenesis (*Année biol.*, **31**, 201).
169. SIEGEL (S. M.). — 1953. On the biosynthesis of lignins (*Physiol. Plant.*, **6**, 134).
170. SIEGEL (S. M.). — 1954. Studies on the biosynthesis of lignins (*Ibid.*, **7**, 41).
171. SIEGEL (S. M.). — 1955. The biochemistry of lignin formation (*Ibid.*, **8**, 20).
172. SIEGEL (S. M.). — 1956. The chemistry and physiology of lignin formation (*Quart. Rev. Biol.*, **31**, 1).
173. SMITH (G. M.). — 1955. *Cryptogamic Botany*. Vol. II : Bryophytes and Pteridophytes, Londres.
174. SMITH (P. F.). — 1957. Studies on the growth of *Citrus* seedlings with different forms of nitrogen in solution cultures (*Plant Physiol.*, **32**, 11).
175. SNOW (R.). — 1925. The correlative inhibition of the growth of axillary buds (*Ann. Bot.*, **39**, 841).
176. SNOW (R.). — 1937. On the nature of correlative inhibition (*New Phytol.*, **36**, 283).
177. SNOW (R.). — 1940. A hormone of correlative inhibition (*Ibid.*, **39**, 177).
178. SNOW (M.) et SNOW (R.). — 1959. Regulation of sizes of leaf primordia by older leaves (*Proc. Roy. Soc. ser. B.*, **151**, 39).
179. SÜDING (H.). — 1955. Korrelationshemmstoffe (*Berich. Dtsch. Bot. Gessels.*, **43**, 536).
180. SOLBERG (R. A.) et HIGINBOTHAM (N.). — 1957. The effects of indolacetic acid, sucrose and eugenol on differentiation in segments of etiolated pea epicotyls (*Amer. J. Bot.*, **44**, 769).

181. SOROKIN (H.) et SOMMER (A. L.). — 1940. Effects of calcium deficiency upon the roots of *Pisum sativum* (Amer. J. Bot., **27**, 308).
182. SOSSOUNTZOV (L.). — 1953. « Croissance, sexualité et dimensions des prothalles de *Gymnogramme calomelanos* en culture aseptique sur quelques milieux azotés minéraux » (Thèse Doct. Paris, publiée en 1957).
183. SOSSOUNTZOV (L.). — 1959. Effets de l'indolacétonitrile sur la morphologie, la croissance et l'histologie du sporophyte de *Marsilea Drummondii* A. Br. (Filicinée, Marsiléacée), en culture aseptique (Rev. Gén. Bot., **66**, 255).
184. STEEVES (T. A.) et SUSSEX (I. M.). — 1957. Studies on the development of excised leaves in sterile culture (Amer. J. Bot., **44**, 665).
185. STEEVES (T. A.) et WETMORE (R. H.). — 1953. Morphogenetic studies on *Osmunda cinnamomea* L.: some aspects of the general morphology (Phytomorphology, **3**, 339).
186. STOWE (B. B.) et THIMANN (K. V.). — 1954. The paper chromatography of indole compounds and some indole-containing auxins of plant tissues (Arch. Biochem. Biophys., **51**, 499).
187. SUSSEX (I. M.) et STEEVES (T. A.). — 1953. Growth of excised fern leaves in sterile culture (Nature, **172**, 624).
188. SUSSEX (I. M.). — 1958. A morphological and experimental study of leaf development in *Leptopteris hymenophylloides* (A. Rich.) Presl. (Phytomorphology, **8**, 96).
189. TERPSTRA (W.). — 1953. « Extraction and identification of growth substances » (Thèse Bot., Lab. Utrecht).
190. THIMANN (K. V.) et SKOOG (F.). — 1934. On the inhibition of bud development and other functions of growth substances in *Vicia faba* (Proc. Roy. Soc. B. Lond., **114**, 317).
191. THIMANN (K. V.). — 1937. On the nature of inhibitions caused by auxin (Amer. J. Bot., **24**, 407).
192. THIMANN (K. V.). — 1955. Corrélations de croissance dans leurs rapports avec l'auxine (Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég., **1**, 8).
193. THIMANN (K. V.). — 1956. L'origine et les fonctions des auxines, Paris.
194. THIMANN (K. V.). — 1957. Growth and growth hormones in plants (Amer. J. Bot., **44**, 49).
195. THOMPSON (J. Mc L.). — 1915. The anatomy and affinity of *Deparia Moorei* Hook (Trans. Roy. Soc. Edinb., **50**).
196. TÖREN (J.). — 1955. Effets des carences minérales sur l'anatomie des tissus végétaux cultivés *in vitro* (Rev. Gén. Bot., **62**, 392).
197. TORREY (J. C.). — 1959. A chemical inhibitor of auxin-induced lateral root initiation in roots of *pisum* (Physiol. Plant., **12**, 873).
198. TOURNAY (R.). — 1951. Le sporophyte de *Marsilea*. Recherches sur *Marsilea hirsuta* R. Br. (La cellule, **54**, 165).
199. TROLL (W.). — 1939. Primär- und Folgeblätter. In *Vergleichende Morphologie der höheren Pflanzen*, Berlin, **1**, **2**, 1388).
200. ULRICH (A.) et OHKI (K.). — 1956. Chlorine, bromine and sodium as nutrients for sugar beet plants (Plant Physiol., **31**, 171).
201. VAN FLEET (P. S.). — 1942. The development and the distribution of the endodermis and an associated oxidase system in Monocotyledonous plants (Amer. J. Bot., **29**, 1).
202. VAN OVERBEEK (J.), OLIVO (D. C.) et DE VASQUEZ (E. M. S.). — 1945. A rapid extraction method for free auxin and its application in geotropic reactions of beans seedlings and sugar cane nodes (Bot. Gaz., **106**, 440).
203. VENNING (F. D.). — 1953. The influence of major mineral nutrient deficiencies on growth and tissue differentiation in the hypocotyl of Marglobe tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. (Phytomorphology, **3**, 315).
204. VOTH (P. D.) et HAMNER (K. C.). — 1940. Responses of *Marchantia polymorpha* to nutrient supply and photoperiod (Bot. Gaz., **102**, 169).
205. VOTH (P. D.). — 1956. Demonstrating mineral-nutrient deficiencies with *Regnelidium diphyllum* (Illinois Acad. Sci. Trans., **48**, 37).

206. WANGERMAN (E.) et ASHBY (E.). — 1951. Studies in the morphogenesis of leaves. VII. Part. I. Effects of light intensity and temperature on the cycle of ageing and rejuvenation in the vegetative life history of *Lemna minor* (*New Phytol.*, **50**, 186).
207. WANGERMAN (E.) et ASHBY (E.). — 1949-1950. A discussion on morphogenesis : morphogenesis in *Lemna minor* (*Proc. Linn. Soc. Lond.*, Session 162, 10).
208. WARDLAW (C. W.). — 1945. Experimental and analytical studies of Pteridophytes. VI. Stelar morphology : the occurrence of reduced and discontinuous vascular systems in the rhizome of *Onoclea sensibilis* (*Ann. Bot. N. S.*, **9**, 383).
209. WARDLAW (C. W.). — 1946. *Ibid.* : VII. Stelar morphology : the effect of defoliation on the stele of *Osmunda* and *Todea* (*Ann. Bot. N. S.*, **9**, 97).
210. WARDLAW (C. W.). — 1947. *Ibid.* : X. The size-structure correlation in the Filicinean vascular system (*Ann. Bot. N. S.*, **11**, 203).
211. WARDLAW (C. W.). — 1947. Experimental investigations of the shoot apex of *Dryopteris aristata* Druce (*Phil. Trans. Roy. Soc. B.*, **232**, 343).
212. WARDLAW (C. W.). — 1948. Experimental morphology with special reference to Pteridophytes (*Symp. Soc. Exper. Biol.*, **2**, 276).
213. WARDLAW (C. W.). — 1949. Further experimental observations on the shoot apex of *Dryopteris aristata* Druce (*Phil. Trans. Roy. Soc. B.*, **233**, 415).
214. WARDLAW (C. W.). — 1952. Experimental and analytical studies of Pteridophytes XVIII. The nutritional status of the apex and morphogenesis (*Ann. Bot. N. S.*, **16**, 207).
215. WARDLAW (C. W.). — 1952. *Phylogeny and morphogenesis*, Londres.
216. WARDLAW (C. W.). — 1955. The chemical concept of organization in plants (*New Phytol.*, **54**, 302).
217. WARDLAW (C. W.) et CUTTER (E. G.). — 1955. Experimental and analytical studies of Pteridophytes. XXX. Further investigations of the formation of buds and leaves in *Dryopteris aristata* Druce (*Ann. Bot. N. S.*, **19**, 515).
218. WARDLAW (C. W.). — 1957. On the organization and reactivity of the shoot apex in vascular plant (*Amer. J. Bot.*, **44**, 176).
219. WARDLAW (C. W.). — 1957. The reactivity of the apical meristem as ascertained by cytological and other techniques (*New Phytol.*, **56**, 221).
220. WARDLAW (C. W.). — 1957. Experimental and analytical studies of Pteridophytes. XXXVII. A note on the inception of microphylls and macrophylls (*Ann. Bot. N. S.*, **21**, 427).
221. WENT (F. W.). — 1936. Allgemeine Betrachtungen über das Auxin-Problem (*Biol. Zentr.*, **56**, 449).
222. WENT (F. W.). — 1939. Some experiments on bud growth (*Amer. J. Bot.*, **26**, 109).
223. WETMORE (R. H.). — 1953. Carbohydrate supply and life development in sporeling ferns (*Science*, **118**, 578).
224. WETMORE (R. H.). — 1954. The use of *in vitro* cultures in the investigation of growth and differentiation in vascular plants (*Brookhaven Symp. in Biol.*, **6**, 22).
225. WETMORE (R. H.). — 1955. Differentiation of xylem in plants (*Science*, **121**, 626).
226. WETMORE (R. H.) et SOROKIN (S.). — 1955. On the differentiation of xylem (*J. Anorl Arboretum*, **36**, 305).
227. WIERSUM (L. K.). — 1958. Density of root branching as affected by substrate and separate ions (*Acta Bot. Neerd.*, **7**, 174).
228. WILLIAMS (R. F.). — 1955. Redistribution of mineral elements during development (*Ann. Rev. Plant Physiol.*, **6**, 25).
229. WILLSTÄTTER (R.). — 1908-1909. Ueber den Calcium- und Magnesiumgehalt einiger Pflanzensäuren (*Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **58**, 438).
230. WOLTERECK (I.). — 1928. Experimentelle Untersuchungen über die Blattbildung amphibischer Pflanzen (*Flora*, **123**, 30).
231. YOUNG (B. S.). — 1954. The effects of leaf primordia on differentiation in the stem (*New Phytol.*, **53**, 445).

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS,
Libraires de l'Académie de Médecine,
120, boul. Saint-Germain, Paris (VI^e).
Dépôt légal : N^o 3640, 1^{er} trim. 1962.

MARCA REGISTRADA

Imprimé en France

3496-3-62. — Imprimerie CRÉTÉ
Paris, Corbeil-Essonne.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

LIGNINE ET LIGNIFICATION

Vu et approuvé :

Paris, le 19 novembre 1960.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PÉRÈS

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie
de Paris,

Jean SARRAILH

